Conf. Dr. EUGENIA SORU

BIOCHIMIE MEDICALĂ

EDITURA DE STAT
PENTRU LITERATURA ȘTIINȚIFICĂ

Scanned with OKEN Scanner

CONF. DR. EUGENIA SORU

BIOCHIMIE MEDICALĂ

CU 180 FIGURI IN TEXT

Scanned with OKEN Scanner

Tabla de materii

Pag.

Tabla de materii 5
Introducere 11

Capitolul I

Biochimia descriptivă. Elementele componente ale materiei vii 13

Partea I-a

Protidele. 13
Aminoacizii 13
Clasificarea aminoacizilor 14
Proprietăţile generale ale aminoacizilor 17
Reacţiile generale de identificare a acizilor aminaţi 22
Principalii acizi aminaţi. 27
Peptidele 43
Sinteza peptidelor 43
Proteidele 48
Proprietăţi. 48
A. Holoproteidele sau proteinele 49
Structura proteinelor. 49
Organizarea stereochimică a moleculei proteinice. 56
Organizarea macromoleculei proteinice 57
Proprietăţile fizice şi chimice ale proteinelor 60
Reacţiile de recunoaştere ale proteinelor 65
Clasificarea proteinelor 66
B. Heteroproteidele 70

Partea II-a

Glucidele. 99
Ozele sau monozaharidele. 100
Proprietăţile generale ale monozaharidelor 101
Constituţia şi structura monozaharidelor (ozelor). 111
Sinteza monozaharidelor 118
Monozaharidele mai importante 119
Ozidele 127
Holozidele. 127
Heterozidele sau glicozidele 140

Partea III-a

Lipidele. 142
Acizii graşi care intră în constituţia lipidelor. 143
Alcoolii care intră în constituţia lipidelor 147
Lipidele 156

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul II

Biocatalizatorii

Pag.

Cataliza 173
Caracterele generale ale fenomenelor catalitice 174
Mecanismul acţiunii catalitice 175

Partea I-a

Vitaminele 178
Avitaminoze — Hipovitaminoze — Hipervitaminoze 178
Clasificarea vitaminelor 179
Vitaminele liposolubile 179
Vitaminele hidrosolubile 198

Partea II-a

Hormonii 217
Hormonii steroizi 218
Hormonii care conţin azot 228

Partea III-a

Enzimele 234
Mecanismul de acţiune al enzimelor 238
Proprietăţile generale ale enzimelor 241
Caractere speciale ale enzimelor 242
Structura enzimelor 252
Clasificarea enzimelor 254
Metodele de izolare şi purificare a enzimelor 261
Determinarea cantitativă a enzimelor 264

Hidrolazele 265
Enzimele care scindează legătura -C-N- 277
Desmolazele 289
Mecanismul oxido-reducerilor 289
Enzime ajutătoare ale desmolizei 322
Transportorii de hidrogen neenzimatici 330
Mecanismul oxidărilor celulare 335
Fermenţii de apărare ai lui Abderhalden 342

Capitolul III

Biochimia sucurilor digestive

Saliva 343
Sucul gastric 346
Bila 354
Sucul pancreatic 356
Sucul intestinal 358

Capitolul IV

Metabolismele intermediare

Generalităţi 359
Definiţii, metode de cercetare 359
Metodele de studiu al metabolismelor intermediare 360
Coeficientul respirator 365
Metabolismul glucidelor 367
Digestia glucidelor 368
Absorbţia glucidelor 370
Glicogenogeneza 371
Transportul glucidelor în organism 374
Catabolismul glicogenului în ţesutul muscular 380

Scanned with OKEN Scanner

Pag.

Resinteza glucidelor . . . 399
Degradarea glucidelor în alte ţesuturi decât cel muscular . . . 401
Turburări ale metabolismului normal al glucidelor . . . 401
Metabolismul lipidelor . . . 404
Metabolismul grăsimilor neutre . . . 405
Digestia şi absorbţia grăsimilor neutre . . . 405
Oxidarea grăsimilor neutre . . . 409
Metabolismul fosfatidelor . . . 417
Metabolismul steridelor . . . 419
Metabolismul carotenoidelor . . . 422
Metabolismul proteinelor . . . 423
Digestia proteinelor . . . 425
Metabolismul general al acizilor aminaţi . . . 426
Catabolismul aminoacizilor . . . 427
Sinteza α-aminoacizilor . . . 436
Metabolismul amoniacului . . . 444
Metabolismul componentei ternare rezultată din desaminarea acizilor aminaţi . . . 449
Metabolismul special al unor aminoacizi . . . 453
Corelaţia dintre metabolismul proteinelor, glucidelor şi lipidelor . . . 435
Metabolismul hemoglobinei . . . 439
Sinteza hemoglobinei . . . 439
Catabolismul hemoglobinei . . . 470
Metabolismul nucleoproteidelor . . . 476
Degradarea nucleoproteidelor . . . 476
Metabolismul mineral . . . 481
Apa . . . 482
Sărurile . . . 484
Antagonismul ionic . . . 491

Capitolul V

Biochimia celulei şi a ţesuturilor

Celula . . . 493
Ţesutul epitelial . . . 505
Ţesutul conjunctiv . . . 506
Ţesutul adipos . . . 506
Ţesutul osos . . . 507
Biochimia dinţilor . . . 508
Ţesutul muscular . . . 511
Structura biochimică a muşchiului . . . 511
Biochimia contracţiei musculare . . . 520
Rolul acizilor adenilici şi fosfagenului în transferul energetic . . . 525
Bilanţul energetic al reacţiilor chimice . . . 529
Ţesutul nervos . . . 533
Modificările chimice care au loc în timpul activităţii nervoase . . . 535
Metabolismul ţesutului nervos . . . 536

Capitolul VI

Biochimia umorilor

Sângele . . . 540
Funcţiile sângelui . . . 540
Izotonia . . . 542
Izoionia sângelui . . . 547
Elementele figurate ale sângelui . . . 582
Globulele roşii . . . 582
Plachetele sanguine sau trombocitele . . . 586
Globulele albe sau leucocitele . . . 587
Coagularea sângelui . . . 588
Mecanismul coagulării . . . 589

Scanned with OKEN Scanner

Pag.

Proprietăţile fizice şi compoziţia chimică a sângelui 592
Proprietăţile fizice ale sângelui 592
Compoziţia chimică a sângelui 593
Limfa. 609
Lichidul cefalorahidian 610
Mediile ochiului 611
Mediile urechii interne 613
Simţurile chimice. 613
Transudate, exudate, lichidul sinovial 614

Capitolul VII

Biochimia secreţiilor

Laptele 616
Lichidul lacrimal. 620
Sperma 620

Capitolul VIII

Biochimia excreţiilor

Mecanismele detoxificării în organism 622
Eliminarea urinară. 626
Funcţiile renale 627
Controlul funcţiei renale 634
Sudoarea 646
Fecalele. 646

Capitolul IX

Energetica substanţei vii

Generalităţi 648
Metabolismul energetic 658
Metodele de studiu ale metabolismului energetic 658
Metoda calorimetriei directe. 659
Calorimetria indirectă sau calorimetria respiratorie 659

Capitolul X

Antibioticele

Partea I-a

Antagoniştii metabolici 677

Partea II-a

Chimia antibioticelor 684
Penicilinele 688
Proprietăţile chimice ale penicilinelor 688
Structura chimică a penicilinelor 689
Streptomicina 694
Proprietăţi fizice ale streptomicinei 694
Structura chimică a streptomicinei 695
Gramicidina şi tiroidina. 698
Aureomicina. 700
Aerospirina 700
Eritrina. 700
Mecanismul general de acţiune al antibioticelor 700

Capitolul XI

Biochimia bacteriilor

Partea I-a

Biochimia bacteriilor 705
Fazele de creştere ale bacteriilor 705
Compoziţia chimică a bacteriilor 706

Scanned with OKEN Scanner

Pag.

Compoziţia elementară a microorganismelor 706
Respiraţia bacteriană. 716
Necesităţile nutritive ale bacteriilor 717
Substanţele de creştere. 718

Partea II-a

Biochimia virusurilor 720
Proprietăţile fizicochimice ale virusurilor 721
Compoziţia chimică a virusurilor. 721
Bacteriofagul. 724
Compoziţia chimică a bacteriofagului coli purificat (T^3) 725

Capitolul XII

Imunochimia

Natura chimică a antigenelor 728
Exotoxine şi endotoxine 728
Natura chimică a anticorpilor. 729
Formarea anticorpilor. 730
Combinarea antigenului cu anticorpul 733
Imunitatea şi sistemul nervos 734
Bibliografie 735
Index alfabetic. 738

Scanned with OKEN Scanner

INTRODUCERE

Biochimia cercetează şi interpretează procesele chimice şi fizico-chimice care intervin în viaţa organismelor.

Ea îşi are rădăcinile pe de o parte în chimie şi fizico-chimie şi pe de altă parte în fiziologie, în sensul ei cel mai larg, îşi iradiază însă acţiunea în toate domeniile biologiei, în patologie, microbiologie, imunologie, farmacologie, terapeutică experimentală.

In lucrarea de faţă, materialul este împărţit în următoarele capitole mari :

I. Biochimia descriptivă
II. Biocatalizatorii
III. Biochimia sucurilor digestive
IV. Metabolismele intermediare
V. Biochimia celulei şi a ţesuturilor
VI. Umorile
VII. Biochimia secreţiilor
VIII. Biochimia excreţiilor
IX. Energetica substanţei vii
X. Biochimia antibioticelor
XI. Biochimia bacteriilor
XII. Imunochimia.

I. *Biochimia descriptivă* se va ocupa cu descrierea şi proprietăţile chimice ale componentelor care intră în structura materiei vii şi anume cu descrierea protidelor, glucidelor, lipidelor.

II. Capitolul despre *biocatalizatori* va cuprinde studiul chimic al catalizatorilor biologici, care intervin în metabolismul intermediar al protidelor, glucidelor, lipidelor şi anume studiul vitaminelor, hormonilor şi enzimelor.

III. In capitolul *„Biochimia sucurilor digestive"* sunt trecute în revistă : saliva, sucul gastric, bila, sucul pancreatic, sucul intestinal. La fiecare sunt expuse pe scurt compoziţia, datele de fiziologie, rolul în metabolism.

IV. Capitolul despre *metabolismele intermediare* va conţine studiul transformărilor chimice ale componentelor din structura materiei vii, în speţă metabolismul protidelor, glucidelor, lipidelor şi al substanţelor minerale.

V. *Biochimia celulei şi a ţesuturilor* va cuprinde descrierea componentelor chimice din diferitele forme structurale ale organismului şi intervenţia acestora în mecanismele fiziologice.

Scanned with OKEN Scanner

VI. In capitolul *„Umorile"* vor fi expuse datele biochimice şi fiziologice privind sângele, limfa, lichidul cefalo-rahidian, etc.

VII. *„Biochimia secreţiilor"* va cuprinde studiul chimic al laptelui, lichidului lacrimal, spermei.

VIII. *„Biochimia excreţiilor"* va cuprinde chimia eliminării urinare, a fecalelor, etc.

IX. *Energetica substanţei vii* va fi o scurtă expunere a datelor de energetică, insistând asupra metabolismului energetic.

X. *Chimia antibioticelor* este un capitol în care sunt expuse pe scurt antagoniştii metabolici şi substanţele antibiotice şi se prezintă modul lor de acţiune.

XI. In *Biochimia bacteriilor* vor fi expuse date biochimice privind constituţia şi metabolismul bacterian.

XII. *Imunochimia* — ultimul capitol — se va ocupa de prezentarea în lumina ultimelor date biochimice a problemelor imunologiei.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL I

BIOCHIMIA DESCRIPTIVĂ

(*Elementele componente ale materiei vii*)

Partea I-a

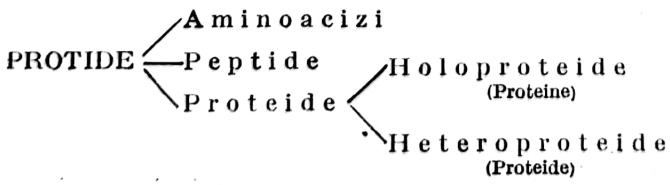
PROTIDELE

Protidele constitue grupa de substanțe organice care alături de glucide și lipide intră în structura materiei vii. Au rol structural și funcțional extrem de important: protoplasma este constituită în cea mai mare parte din protide; ele intră în structura multor componenți chimici cu rol funcțional de bază, hormoni, enzime; intră în structura nucleilor celulari; sunt considerate ca materie vie prin excelență. Cuvântul proteină derivă dela cuvântul grecesc protos = cel dintâi.

In nomenclatura veche, protidele se mai numeau și substanțe proteice sau proteine. Protidele conțin în molecula lor în mod constant C, H, O și N, frecvent S și P. Unele conțin și elemente minerale, în special Fe. Caracteristică este valoarea procentului de N: între 16—19%. Valoarea calorică este de 4,1 calorii. Sunt deci izodiname cu glucidele, pe când lipidele au valoare calorică mai mare.

S'a convenit a se clasifica în grupa protidelor toți compușii chimici care prin hidroliză eliberează aminoacizi, precum și aminoacizii înșiși. Fac parte astfel din această grupă: aminoacizii, peptidele și proteidele. Proteidele se împart la rândul lor, în holoproteide sau proteine și heteroproteide sau proteide.

Schematic, această clasificare se poate reprezenta astfel:

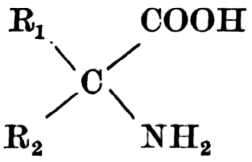


Vom studia fiecare grupă în parte, începând cu grupa elementelor constitutive ale protidelor, grupa aminoacizilor.

AMINOACIZII

Aminoacizii sunt compuși chimici care conțin în molecula lor grupări aminice — NH_2 *și grupări carboxilice* — COOH.

Au formula generală :



unde R_1 și R_2 pot fi radicali alifatici sau ciclici.

Se pot astfel socoti ca acizi organici, în care hidrogenul din catena hidrocarburii este înlocuit printr'o grupare aminică — NH_2, sau se pot socoti ca rezultând din amoniac prin substituirea de radicali organici în locul hidrogenului. Dacă se notează cu α carbonul vecin grupării carboxilice, ceilalți atomi de carbon vor fi notați cu β, γ, δ sau ε ; vor fi astfel α, β, γ, δ sau ε - aminoacizi, după poziția carbonului la care este fixată gruparea aminică, în raport cu cea carboxilică.

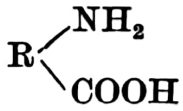
S'au putut izola din molecula proteinelor 30 de aminoacizi diferiți. Vom arăta care sunt cei mai importanți dintre ei.

CLASIFICAREA AMINOACIZILOR

Aminoacizii se împart, după natura radicalului, în două grupe mari, *aminoacizi alifatici* și *aminoacizi ciclici*. Aceste două grupe mari se împart în subgrupe după numărul de grupări aminice și acide pe care le conțin, și anume acizi *monoaminomonocarboxilici, acizi diaminomonocarboxilici, acizi monoaminodicarboxilici, oxiaminoacizi, tioaminoacizi, aminoacizi aromatici, aminoacizi heterociclici.*

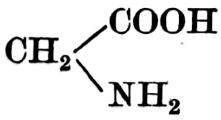
I. Seria aciclică

A. Grupa acizilor monoaminomonocarboxilici
(*aminoacizi monobazici*) :



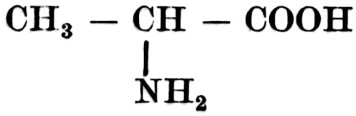
Reprezentanți mai importanți ai clasei sunt :

1. **Glicocolul** : cu 2 atomi de C



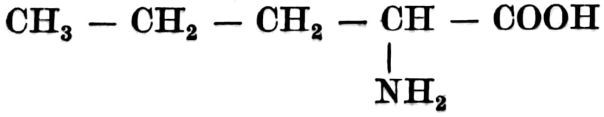
sau glicina san acidul α - aminoacetic

2. **Alanina** : cu 3 atomi de carbon



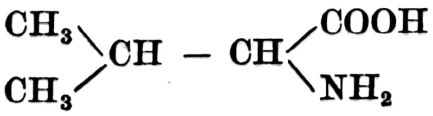
sau acidul α - aminopropionic

3. **Norvalina** :



sau acidul α - aminovalerianic

4. **Valina** :



sau acidul α — aminoizovalerianic

Scanned with OKEN Scanner

5. **Norleucina :** $CH_3 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH(COOH)(NH_2)$ sau acidul α - amino- n - caproic

6. **Leucina :** $(CH_3)_2CH - CH_2 - CH(COOH)(NH_2)$ sau acidul α - aminoizocaproic

7. **Izoleucina :** $CH_3 - CH_2 - CH(CH_3) - CH(COOH)(NH_2)$ sau acidul α-amino-β-metil-valerianic

B. **Grupa acizilor monoaminodicarboxilici**
(aminoacizi bibazici)

8. **Acidul aspartic :** $HOOC - CH_2 - CH(COOH)(NH_2)$ sau acidul asparagic sau α-aminosuccinic

9. **Acidul glutamic :** $HOOC - CH_2 - CH_2 - CH(COOH)(NH_2)$ sau acidul α-aminoglutaric

C. **Grupa acizilor diaminomonocarboxilici** $(H_2N)_2=R-COOH$

10. **Ornitina :** $CH_2(NH_2)_\delta - CH_2 - CH_2 - CH(NH_2)_\alpha - COOH$ sau acidul α-δ-diamino-valerianic

11. **Lizina :** $CH_2(NH_2)_\varepsilon - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH(NH_2)_\alpha - COOH$ sau acidul α - ε - di-aminocaproic

12. **Arginina :** $HN=C(NH_2)-NH-CH_2-CH_2-CH_2-CH(COOH)(NH_2)$ sau acidul δ-guanido -α-amino-valerianic

D. **Grupa oxiaminoacizilor** $H_2N - R(OH) - COOH$

13. **Serina :** $CH_2(OH) - CH(NH_2)(COOH)$ sau oxialanina sau acidul α - amino-β - hidroxipropionic

14. **Treonina :** $CH_3 - CH(OH) - CH(NH_2) - COOH$ sau acidul α - amino β - hidroxibutiric

15. **Acidul oxiglutamic :** $CH_2(COOH) - CH(OH) - CH(COOH)(NH_2)$ sau acidul β - oxi - α - a mi noglutaric

Scanned with OKEN Scanner

E. **Grupa tioaminoacizilor**

Conţin S sub formă de tiol — SH sau ca grupări funcţionale derivând din acesta.

16. **Cisteina :** $HS - CH_2 - \underset{\alpha}{CH}(COOH)(NH_2)$ sau acidul α-amino β-tiopropionic

17. **Cistina :** $HOOC(H_2N)CH - CH_2 - S - S - CH_2 - CH(COOH)(NH_2)$ acidul ditio α-amino-β-tiopropionic

produs de condensarea a două molecule de cisteină cu eliminare de H_2

18. **Metionina :** $CH_3 - S - CH_2 - CH_2 - \underset{\alpha}{CH}(COOH)(NH_2)$ sau acidul α-amino-γ-metiltiobutiric

II. Seria ciclică

A. **Grupa aminoacizilor aromatici**

19. **Fenilalanina :** $C_6H_5 - CH_2 - CH(NH_2) - COOH$ sau acidul β - fenil - α - amino-propionic

20. **Tirozina :** $HO - C_6H_4 - CH_2 - CH(NH_2) - COOH$ sau paraoxifenilalanina

B. **Grupa aminoacizilor heterociclici**

Cu ciclul pirolic în moleculă

21. **Prolina :** $H_2C(CH_2)CH_2 - CH(NH) - COOH$ sau acidul pirolidin-α-carboxilic

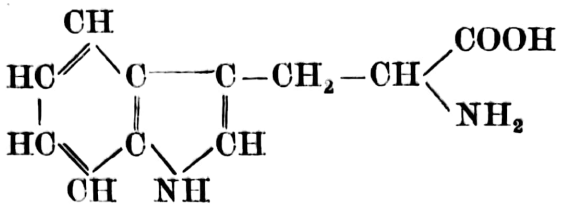
22. **Oxiprolina :** $HO - HC(CH_2) - CH_2 - CH(NH) - COOH$ sau acidul β-oxipirolidin-α-carboxilic

Nucleu iminazolic are :

23. **Histidina :** $HC(HN)=C(N)=CH - CH_2 - CH(NH_2) - COOH$ sau β-iminazolilalanina

Conțin nucleu indolic :

24. **Triptofanul** :



sau indolilalanina

25. **Hidroxitriptofanul.**

In afară de acești 25 aminoacizi mai există în natură 17 aminoacizi care apar mai rar în structura proteinelor naturale.

PROPRIETĂȚILE GENERALE ALE AMINOACIZILOR

1. Sunt substanțe incolore, solide, cristalizate, cristalele având forme caracteristice fiecărui aminoacid ; sunt solubili în apă cu excepția cistinei și tirozinei.

2. Sunt *optic activi*, afară de glicocol.

3. In soluție, acizii monoaminomonocarboxilici sunt practic neutri ; aceasta înseamnă că funcția acidă COOH și funcția bazică NH_2 se compensează intramolecular reciproc. In soluție, aminoacizii nu se găsesc sub formă nedisociată, ci sub formă de *amfion* (ioni bipolari, sau dipoli sau zwiterioni) :

$$H_2 - R - COOH \rightleftarrows H_3N^{(+)} - R - COO^{(-)}$$

Sunt *amfolite*. In soluție există un echilibru între forma nedisociată $H_2N - R - COOH$ și forma de amfion : $H_3N^{(+)} - R - COO^{(-)}$, echilibru deplasat cu mult către forma amfion. De exemplu, în cazul glicocolului, raportul e de 1 : 310 000 la 20° și de 1 : 160 000 la 30°. In soluție, forma nedisociată e deci neglijabilă.

S'a constatat că și cristalele aminoacizilor sunt construite din amfioni reținuți în rețeaua cristalului prin forțe electrostatice puternice. Cu ajutorul razelor X s'au determinat distanțele interatomice. De exemplu, între C și O din gruparea carboxilică distanța este de 1.27 Å — 1.25 Å, distanță egală cu aceea dintre C și O din carboxilul complect ionizat (1.27 Å). Distanța dintre cei doi atomi de carbon este cea uzuală (1.54 Å), ca la hidrocarburi, dar distanța C—N e mai mică decât distanța $C-NH_2$ în amine — probabil datorită sarcinii pozitive a grupării NH_3, din amfion.

Conținând în acelaș timp grupări acide și bazice, aminoacizii funcționează ca amfolite, și după pH-ul mediului în care se găsesc vor putea juca rol de baze sau de acizi. In mediu acid se comportă ca bazele, în mediu alcalin se vor comporta ca acizii :

1) $H_3N^{(+)} - R - COO^{(-)} + H^{(+)} + Cl^{(-)} \rightarrow H_3N^{+} - R - COOH + Cl^{-}$.

2) $H_3N^{(+)} - R - COO^{(-)} + Na^{(+)} + OH^{-} \rightarrow H_2O + H_2N - R - COO^{(-)} + Na^{(+)}$

Datorită acestui caracter, amfolitele pot funcționa ca sisteme tampon.

Amfolitele în general și aminoacizii în special pot funcționa ca acizi sau ca baze după cum se găsesc într'o soluție cu un pH deasupra sau dedesubtul pH-ului izoelectric al amfolitului.

Dăm un tabel al punctelor izoelectrice corespunzătoare unor aminoacizi mai importanți. Se vede că, în general, punctul izoelectric al acizilor

C-53426

monobazici (glicocolul, alanina, tirozina) e în zona acidă, dar aproape de punctul de neutralitate 7, în timp ce acidul bibazic (acidul asparagic) are pH-ul izoelectric în zona foarte acidă (2,8), iar diaminoacidul monobazic, lizina, are un pH în zona alcalină (9,9). Deci, gruparea acidă COOH a acidului monobazic se echilibrează aproape complect cu gruparea bazică NH_2.

Tabelul Nr. 1

Ph-ul izoelectric al unor aminoacizi

	pHi
Glicocol	6,08
Alanină	6,04
Tirozină	5,7
Acid asparagic	2,8
Lizină	9,9

Acizii *monoaminomonocarboxilici* sunt acizi slabi, au pHi aproape de neutralitate. Tirozina, deşi acid monoaminomonocarboxilic, e totuşi un acid mai puternic, are pHi mai departe de punctul de neutralitate şi acest lucru se explică printr'o influenţă a grupării fenil din molecula tirozinei. *Acidul monoaminodicarboxilic* (acidul asparagic) are caracter acid net : are pHi=2,8. Acizii din această grupă sunt acizi destul de puternici. Acizii *diaminomonocarboxilici* au dimpotrivă un caracter bazic (predomină funcţia NH_2). Lizina are pHi 9,9.

Datorită proprietăţii lor de a fi amfolite, acizii aminaţi trebue să aibă la pHi o egală disociaţie acidă şi bazică. Disociaţia aminoacidului la acest punct este maximă, el se găseşte în special sub formă de acid liber, nu sub formă de sare. Dincolo de acest punct se găseşte sub formă de sare cu acizi, sub acest punct sub formă de sare cu bazele. Deoarece sărurile acizilor aminaţi sunt mai solubile decât acizii liberi, la pH-ul izoelectric, unde acidul e în majoritate sub formă liberă, va fi *minimul său de solubilitate*; această proprietate e folosită ca metodă de determinare a pHi. Cunoaşterea pHi al unui amfolit este extrem de importantă pentru a cunoaşte comportarea amfolitului în soluţia în care se găseşte, şi anume comportarea lui ca acid sau ca bază. Punctul izoelectric al acizilor aminaţi se determină :

1. Prin determinarea pH-ului la care se găseşte minimul de solubilitate al aminoacidului.

2. Prin metoda cataforezei : sub pHi, aminoacidul va funcţiona ca bază, deci ca un cation (încărcare +) şi va migra la catod (polul —); deasupra pHi va funcţiona ca un acid, deci ca un anion (încărcare —), va migra la anod (polul +). La pHi, unde disocierea acidă e egală cu cea bazică, aminoacidul nu va prezenta migrare electrică. Viteza de migrare sub pHi şi deasupra lui scade cu cât ne apropiem de pHi.

Proprietăţile chimice generale ale aminoacizilor

Proprietăţile chimice ale aminoacizilor decurg din prezenţa grupărilor COOH şi NH_2 în molecula lor. Ele vor fi determinate deci pe de o parte de gruparea acidă CCCH, pe de alta de gruparea bazică NH_2.

A. Reacţiile grupării aminice :

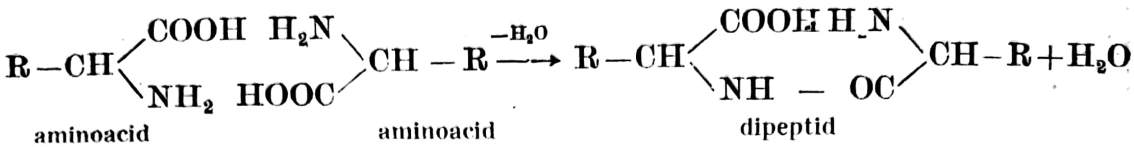
1. Cu grupările acide :

a) *Cu clorurile acizilor organici* formează compuşi acilaţi. De exemplu, din glicocol şi clorură de benzoil se formează acid hipuric :

$$\begin{array}{l} CH_2 - COOH \\ | \\ NH_2 \end{array} + ClCOC_6H_5 \longrightarrow \begin{array}{l} CH_2COOH \\ | \\ NH - CO - C_6H_5 \end{array} + HCl$$

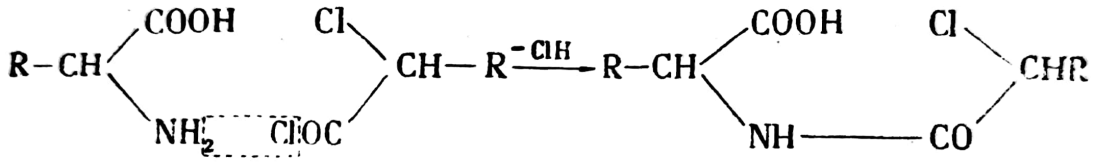
glicocol — clorură de benzoil — acid hipuric

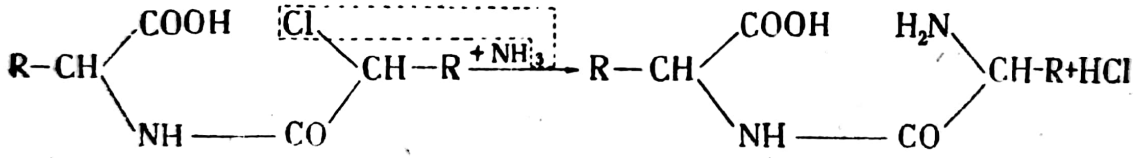
b) *Cu gruparea acidă a unui alt aminoacid realizează* aşa numita legătură peptidică. Această reacţie este extrem de importantă, deoarece duce la formarea peptidelor, respectiv a proteinelor:



aminoacid aminoacid dipeptid

Realizarea acestei legături peptidice rezultate prin eliminarea unei molecule de apă între gruparea aminică a unui aminoacid şi gruparea carboxilică a altuia, este prima etapă pentru formarea proteidelor în ţesuturi. In laborator sinteza di-, tripeptidelor nu se poate face direct plecând dela doi acizi aminaţi, ci dintr'un derivat al unuia din ei şi un acid aminat. Cu această metodă a reuşit pentru prima oară E. Fischer sinteza peptidelor dintr'un acid aminat şi clorura unui acid clorat. Se obţine un compus din care, prin acţiunea NH_3, se formează peptidul.

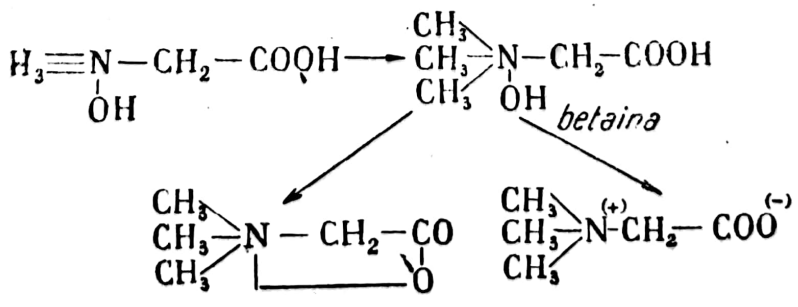




Cu această metodă s'a reuşit să se obţină polipeptide conţinând până la 20 de aminoacizi în moleculă.

2. **Formarea betainelor.** Hidrogenii din gruparea aminică se pot substitui prin *radicali alchilici,* de exemplu prin metili, cu transformarea N trivalent în N pentavalent. Aceşti compuşi se numesc betaine. In concepţia veche se considera că betainele au o structură ciclică rezultată prin eliminarea unei molecule de apă între OH dela N şi H din gruparea carboxilică. Cercetările mai noi atribue însă betainelor, ca şi acizilor aminaţi de altfel, o structură de amfion.

Ca exemplu prezentăm cazul celei mai simple dintre betaine, betaina glicocolului sau betaina propriu zisă:

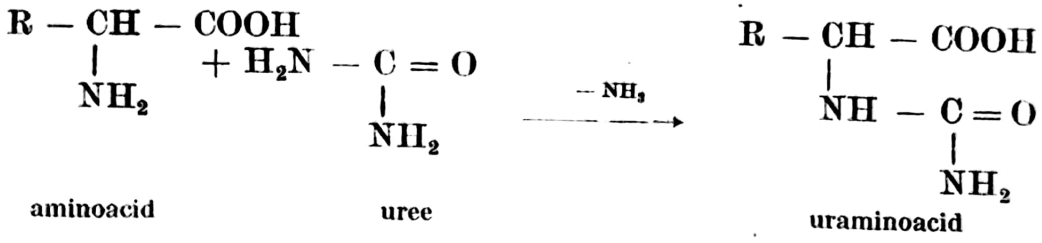


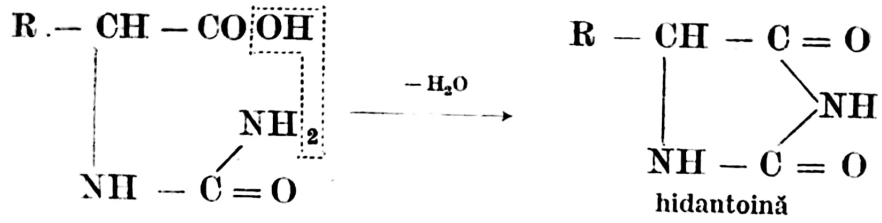
structură ciclică structură în amfion

Betainele au o mare importanță biologică; se pot socoti, conform structurii lor, ca săruri cuaternare de amoniu.

3. Formarea hidantoinelor. Prin fixarea unei molecule de uree la gruparea aminică cu scindare de amoniac, se obține un acid uraminic. Acesta pierde o moleculă de apă și formează prin ciclizare compuși numiți hidantoine.

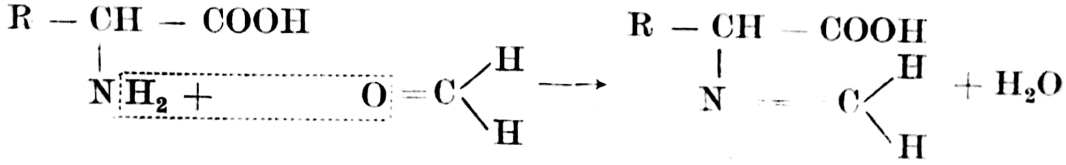
De exemplu :



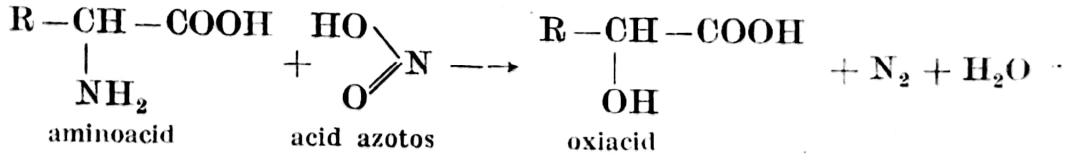


Hidantoinele ca și uraminoacizii servesc la identificarea aminoacizilor.

4. Fixarea de grupare metilenică. Gruparea aminică poate fixa gruparea metilenică $= CH_2$ sub formă de *metilenamină*, sub acțiunea formolului (aldehida formică). Oxigenul din aldehida formică se elimină cu 2H din gruparea NH_2. Această reacție este interesantă și e folosită în metoda de titrare a acizilor aminați cu formol (metoda Sörensen), deoarece derivatul metilenic format este un acid mai tare (nu mai conține gruparea aminică) :



5. Desaminarea. Gruparea aminică poate fi eliminată din aminoacizi sub acțiunea acidului azotos, rezultând N_2 liber, oxiacidul corespunzător acidului aminat și H_2O. Are loc deci o reacție de desaminare :



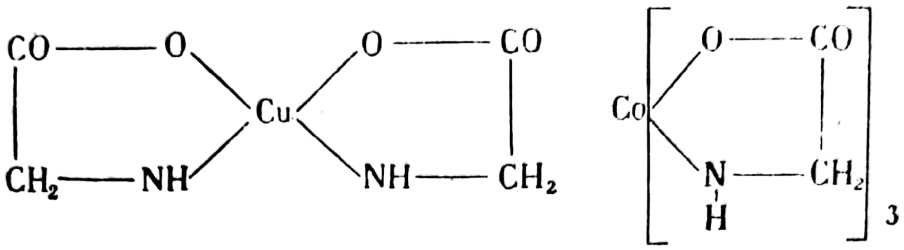
Pentru fiecare grupare aminică se eliberează o moleculă de N_2 și deaceea această reacție e utilizată în dozarea cantitativă a acizilor aminați prin metoda Van Slyke.

Desaminarea acizilor aminați se poate realiza pe cale biochimică. E o transformare frecventă în organismul animal; ea conduce la oxiacidul corespunzător și are loc sub acțiunea unor enzime specifice, desaminazele.

B. Reacţiile grupării carboxilice

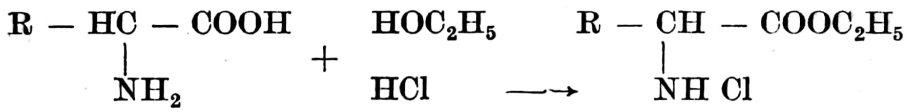
Aceste reacţii sunt mai puţin variate decât ale grupării aminice.

1. **Formarea de săruri cu metalele** : α şi β-aminoacizii pot forma cu metalele grele săruri *complexe interne,* cu structura ciclică de tipul sărurilor coordinative complexe; de exemplu cu Cu, cu Co.



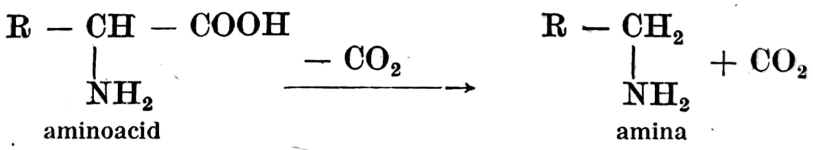
Cuprul formează o sare complexă cu două molecule de glicocol, de culoare albastră, greu solubilă; cobaltul, o sare complexă cu trei molecule de glicocol.

2. **Formarea de esteri cu acizii.** Se realizează esterificarea dacă se barbotează acid clorhidric în soluţia aminoacidului cu un alcool. Alcoolul esterifică gruparea acidă, iar HCl se fixează la gruparea aminică. Nu se obţine astfel esterul liber, ci esterclorhidratul, şi din acesta, sub acţiunea alcalilor, se eliberează esterul:



Cu această metodă, E. Fischer a eliberat esterii acizilor aminaţi şi a identificat prezenţa lor în proteine. Prin hidrogenarea esterilor se obţin aminoaldehide şi chiar aminoalcooli.

3. **Decarboxilarea** acizilor aminaţi duce la formarea de CO_2 şi amine corespunzătoare:



Această reacţie este foarte importantă din punct de vedere biologic. Numeroase bacterii (*bac. coli, subtilis,* etc.), în mediu slab acid, pot realiza această decarboxilare cu transformare în aminele corespunzătoare. Astfel. bacteriile intestinale şi cele de putrefacţie decarboxilează aminoacizii şi formează amine, din care unele toxice, de exemplu *putresceina* care rezultă din desaminarea ornitinei.

Deasemenea, în ţesuturi există enzime care produc decarboxilarea acizilor aminaţi, cu formare de amine importante din punct de vedere biologic, aşa numitele amine proteinogene, de exemplu din tirozină *tiamina,* din histidină *histamina.* (Vom reveni ulterior asupra acestor amine importante).

Drojdia de bere poate realiza atât decarboxilarea, cât şi desaminarea aminoacizilor, cu formare de alcooli corespunzători — acţiune datorită enzimelor specifice fiecărui aminoacid.

Structura sterică a aminoacizilor

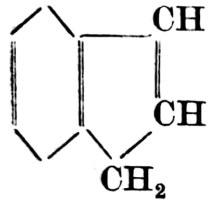
Toți aminoacizii, afară de glicocol, au un C asimetric, pot deci avea doi antipozi optici. Prin sinteză, bineînțeles, se obțin numai formele racemice. Scindarea izomerilor optic activi din produsele racemice e destul de grea. Scindarea biologică duce uneori la rezultate bune. (Drojdia de bere și unele bacterii consumă numai unul din antipozii optici).

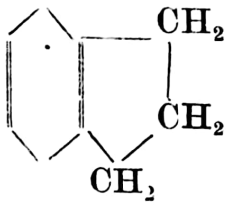
Din stabilirea configurației sterice a acizilor aminați s'a constatat că *toți acizii aminați naturali care intră în structura proteinelor aparțin seriei l*; foarte puțini compuși conțin aminoacizi aparținând seriei *d*.

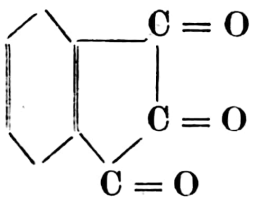
REACȚIILE GENERALE DE IDENTIFICARE A ACIZILOR AMINAȚI

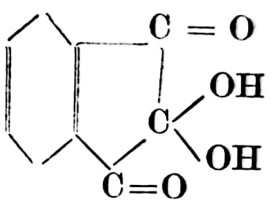
Acizii aminați se pot pune în evidență prin 1) reacția cu ninhidrină și 2) prin reacția cu acidul β-naftochinonsulfonic.

1. **Reacția ninhidrinei** constă în apariția unei colorații albastre la încălzirea unei soluții de aminoacid cu ninhidrină. Ninhidrina este un tricetohidrindenhidrat, este o tricetonă hidratată :

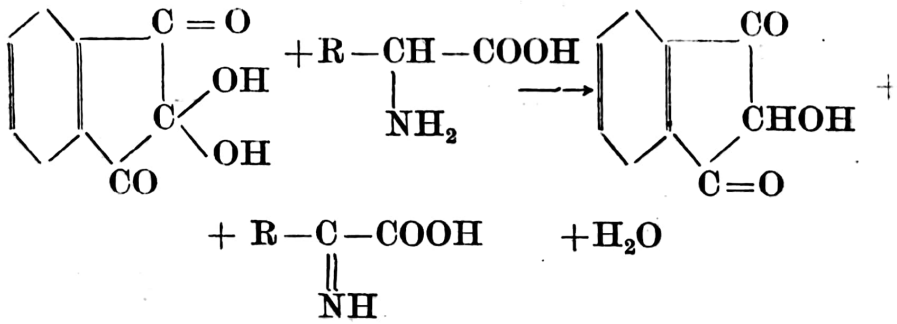

inden

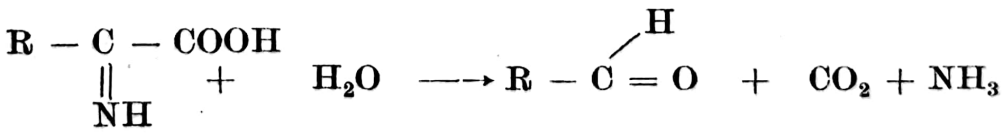

hidrinden

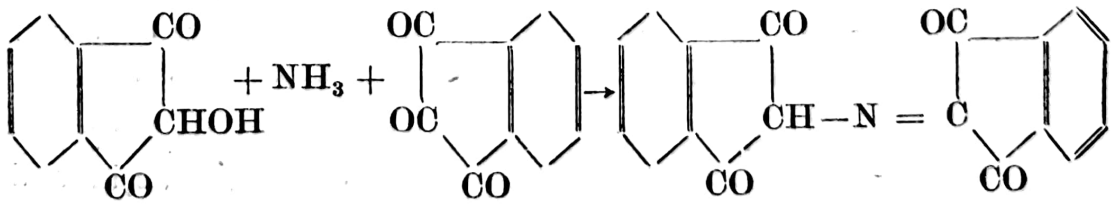

tricetohidrinden


tricetohidrindenhidrat (ninhidrină)

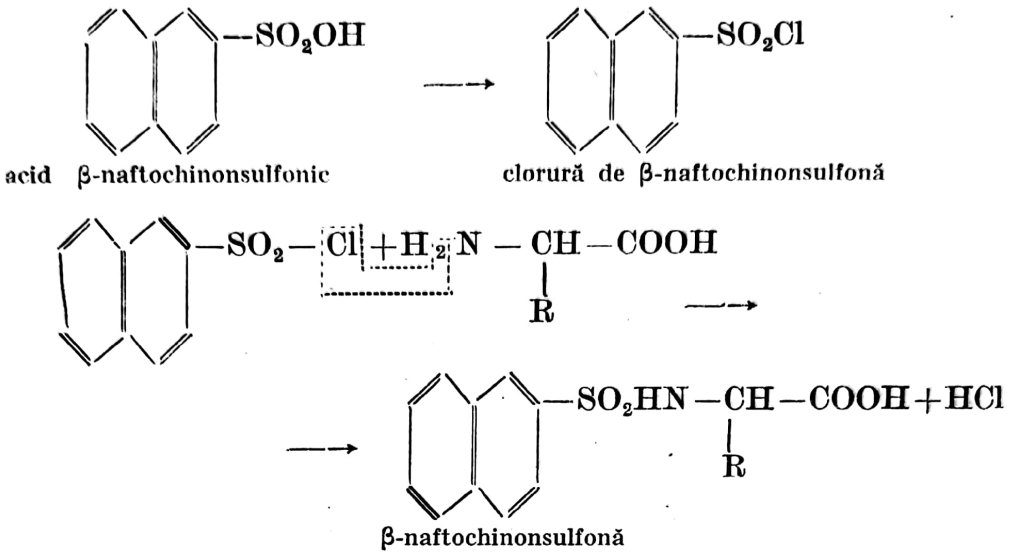
Reacția nu e însă specifică pentru aminoacizi, deoarece se produce și în prezența sărurilor de amoniu și a aminelor :

1)


2)


3)

colorant albastru

2. Reac ia cu acidul β-naftochinonsulfonic dă o culoare roşie-brună. In această reacţie are loc o cuplare a acidului aminat cu acidul β-naftochinonsulfonic, cu formare de β-naftochinonsulfonă colorată.



acid β-naftochinonsulfonic — clorură de β-naftochinonsulfonă

β-naftochinonsulfonă

Reacţia este folosită şi ca metodă de dozare cantitativă a aminoacizilor.

Alte reacţii folosite pentru dozarea acizilor aminaţi sunt :

3. reacţia cu formol (*metoda Sörensen a formol-titrării*) şi

4. reacţia cu acid azotos care constitue principiul metodei *Van Slyke* bazată, cum am spus, pe acţiunea acidului azotos asupra aminoacizilor şi în care se degajează o moleculă de azot pentru fiecare grupare NH_2.

In formol-titrare se face o blocare a grupării aminice cu gruparea $=CH_2$; gruparea acidă liberă e titrată ulterior cu alcali, în prezenţa fenolftaleinei (vezi reacţiile aminoacizilor datorite grupării NH_2).

5. Identificarea aminoacizilor prin cromatografie. Metoda cromatografică a fost imaginată de botanistul rus Mihail Semenovici Ţvet (1906). Este una din cele mai interesante metode de analiză calitativă şi cantitativă care permite separarea spaţială pe un singur adsorbant, a componentelor chimice dintr'un complex. Cu ajutorul acestei metode, Ţvet separă pentru prima oară pigmenţii conţinuţi în frunzele verzi. Pigmenţii sunt extraşi cu eter de petrol, iar extractul este trecut peste o coloană formată din carbonat de calciu fin pulverizat, conţinut într'un tub de sticlă vertical (vezi fig.). El constată că pigmenţii sunt adsorbiţi în regiuni diferite ale coloanei formând inele divers colorate (galben, verde) şi numeşte acest fenomen cromatogramă (vezi fig. 1 Cromatograma extractului de frunze după Ţvet).

In această experienţă, Ţvet demonstrează că în clorofila plantelor verzi sunt mai mulţi pigmenţi. Coloana verticală conţinând substanţa

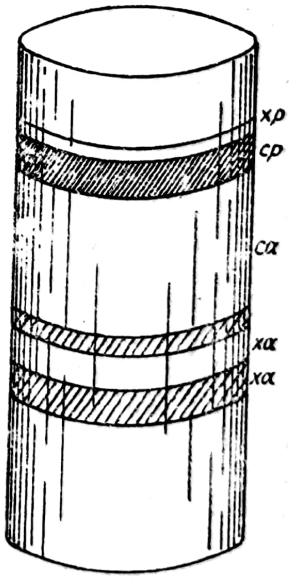


Fig. 1. Cromatograma extractului de frunze verzi, (după *Tvet*).

adsorbantă şi substanţa (substanţele) adsorbite — constituind coloana de adsorbţie — poate fi scoasă din tubul de sticlă şi se pot tăia astfel diversele regiuni colorate (fig. 2). Din aceste regiuni, cu ajutorul unui solvent adecuat, numit „eluent", se poate separa sau „elua" compusul respectiv, adsorbit.

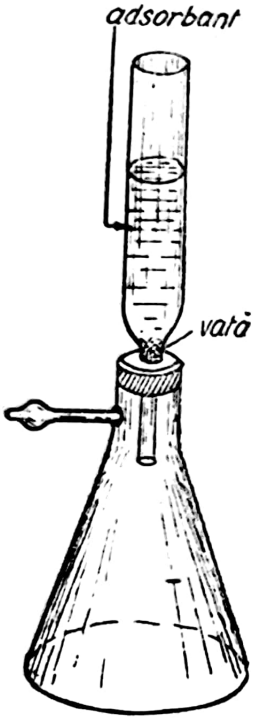


Fig. 2. Aparat simplu pentru analiza cromatografică (după *Ţvet*).

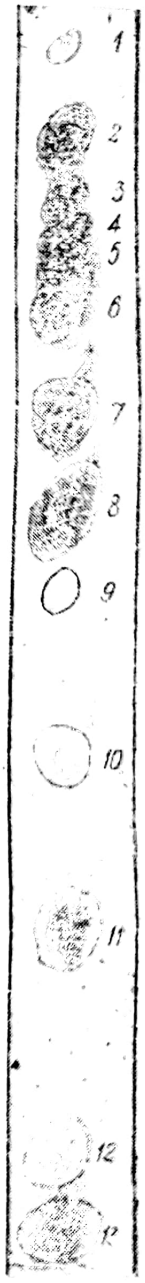
Ţvet face analogie între metoda sa de analiză cromatografică şi analiza luminii cu ajutorul unei prisme. Ca şi radiaţiile luminoase ale spectrului, un amestec de pigmenţi poate fi sistematic separat de constituenţii săi pe coloana de carbonat de calciu, constituenţi care pot fi ulterior determinaţi calitativ şi cantitativ.

Cromatografia, adică procesul de separare a substanţelor prin trecerea soluţiilor printr'o coloană de adsorbant şi eluarea ulterioară cu un solvent adecuat, a devenit una din metodele cele mai importante de studiu în chimia analitică şi preparativă — organică şi anorganică. Cercetători ulteriori au desvoltat folosirea acestei tehnici fără a o modifica în esenţa ei.

Ca adsorbanţi se folosesc în general alumina, gipsul, carbonatul de calciu, cărbunele, amidonul, etc.

Metoda cromatografică, imaginată de Ţvet este bazată pe stabilirea unui echilibru între o fază solidă şi una lichidă. O nouă metodă de cromatografie descrisă sub numele de *„cromatografie de partiţie"* constă în stabilirea unui echilibru între două faze lichide, una din ele fiind menţinută sub formă de gel.

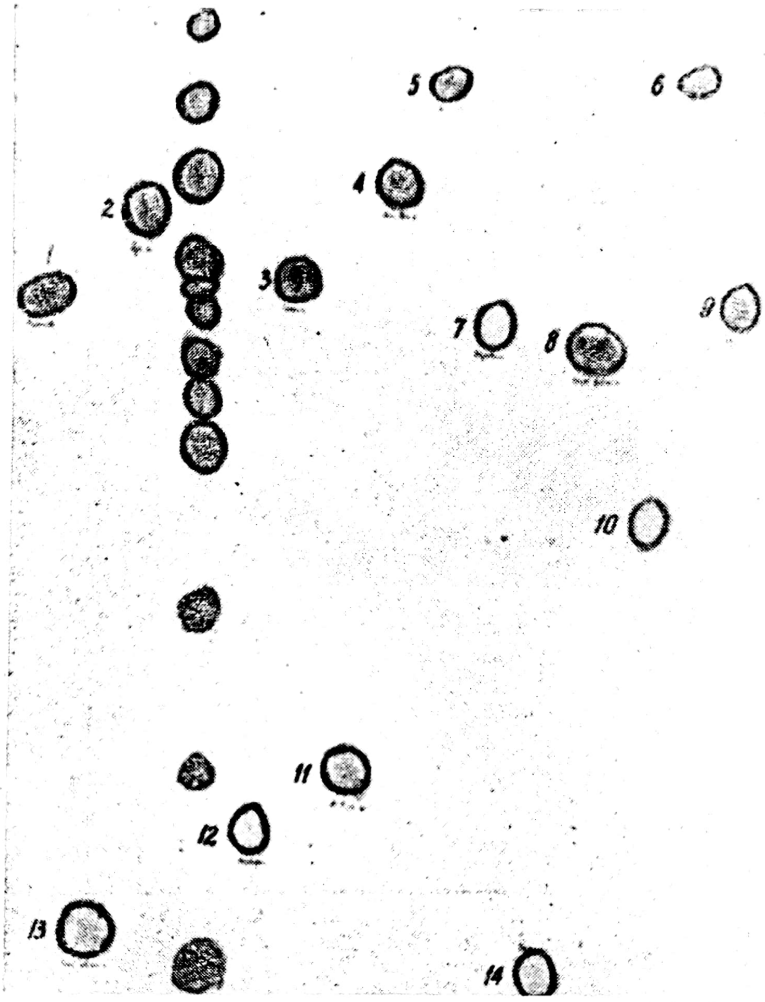
Se foloseşte de exemplu o coloană de silicogel care joacă rolul uneia din fazele de adsorbţie. Amestecul de analizat e disolvat într'un lichid nemiscibil cu apa (cloroform, acetat de etil). Separarea componentelor din amestec este în funcţie de coeficientul de partiţie dintre cele două lichide nemiscibile şi nu de afinitatea de adsorbţie. Acesta este principiul aşa numitei metode de „cromatografie de partiţie" (1941, Martin şi Synge). Metoda aceasta a fost folosită în studiul calitativ şi cantitativ al hidrolizatelor proteinice. Folosind soluţia 0,5% alcool butiric în cloroform, s'a reuşit separarea cantitativă a derivaţilor acetilaţi ai aminoacizilor. Cu această metodă s'a reuşit separarea şi dozarea aminoacizilor din antibioticul gramicidina, polipeptid elaborat de o bacterie din sol (vezi capitolul antibioticelor). Cromatografia de partiţie este o metodă foarte utilă în studiul aminoacizilor din structura proteinelor şi, în general, a unor amestecuri de compuşi (acizi graşi, minerale, zaharuri, etc.) (fig. 3).



1. Cistina (sau cisteina) 2. Ornitina 3. Lizina 4. Acid aspartic 5. Serina 6. Glicocol 7. Acid glutamic 8. Alanina 9. Prolina 10. Tirozina 11. Metionina 12. Fenilalanina 13. Leucina.

Fig. 3. Cromatografia virusului poliedriei viermelui de mătase. Aminoacizi componenţi (irigare butonal-acid acetic)

Un progres important în tehnica cromatografică, a constituit folosirea hârtiei de filtru ca fază staționară, în locul silicogelului (Martin și Synge, 1944). Metoda a fost inițial aplicată studiului calitativ al aminoacizilor dintr'un hidrolizat proteinic oarecare (fig. 4) și ulterior, extinsă la studiul zaharurilor, acizilor nucleici, diverșilor ioni, derivaților hemoglobinei, antibioticelor, a fracțiunilor serice, etc.



1. Glicocol 2. Lizina 3. Serina 4. Ornitina 5. Cisteina 6. Cistina 7. Oxiprolina 8. Acid glutamic. 9. Arginina 10. Prolina 11. Metionina 12. Triptofan 13. Fenilalanina 14. Leucina.

Fig. 4. Cromatografia unei proteine; harta aminoacizilor cunoscuți.

Pe fâșia de hârtie de filtru se aplică la distanța de 6 cm câte 0,01 cc din soluția de analizat, cu ajutorul unei micropipete. Se introduce capătul superior al hârtiei într'un jghiab ce conține lichidul de irigare (soluție saturată butanol-acid acetic-apă, fenol-apă, etc.). Se lasă să irige un timp determinat menținând temperatura constantă și o atmosferă saturată cu vaporii lichidului de irigare respectiv. In timpul irigării, lichidul antrenează în direcție descendentă aminoacizii (de exemplu) din soluția depusă la punctul de plecare. Ulterior, fâșiile de hârtie sunt uscate în etuvă (105°—110°) și pulverizate (pentru „developare") cu lichidul de developare adecuat (de exemplu soluție de ninhidrină 0,1% în butanol, pentru aminoacizi). In cursul uscării la etuvă, care urmează developării, apar petele colorate caracteristic pe fondul alb al hârtiei (pete brune, la zaharuri; pete roz-violet la aminoacizi, etc.).

Identificarea spoturilor care apar se face cu ajutorul „hârtiei de aminoacizi" (operația se face la fel, utilizând soluții de aminoacizi cunoscuți) și stabilirea valorilor R_F caracteristice fiecărei componente (aminoacid, zahar, etc.).

R_F este valoarea raportului: $\frac{\text{Distanța străbătută de substanță}}{\text{Distanța străbătută de solvenți}}$

și, în condițiuni determinate, reprezintă o constantă pentru fiecare componentă.

Cromatografia de tipul celei descrise, efectuată într'o singură direcție — numită *„cromatografia unidimensională"* — este complectată de *„cromatografia bidimensională"* în care caz se utilizează două lichide de irigare — fiecare pe câte o direcție a hârtiei de filtru, astfel :

butanol-acid acetic-apă.

fenol | lutidină-colidină, etc.

apă ↓

Utilizarea cromatografiei bidimensionale permite separarea unor componenți care într'unul din lichidele de irigare ar avea valorile R_F foarte apropiate, astfel că spoturile lor s'ar suprapune și ar împiedica identificarea lor.

Pentru o mai bună separare spațială a aminoacizilor, de exemplu dintr'un hidrolizat proteinic se utilizează *electrocromatografia* pe hârtie de filtru netedă prin care se realizează concomitent cu irigarea și electroforeza aminoacizilor (fig. 5). In acest scop se folosesc electrozi de platină introduși pe marginea hârtiei de filtru puși în legătură cu o sursă de curent electric continuu, în tot timpul irigării. Aminoacizii electropozitivi se regăsesc la catod, cei electronegativi migrează la anod, iar cei electroneutri rămân pe direcția verticală descendentă de irigare.

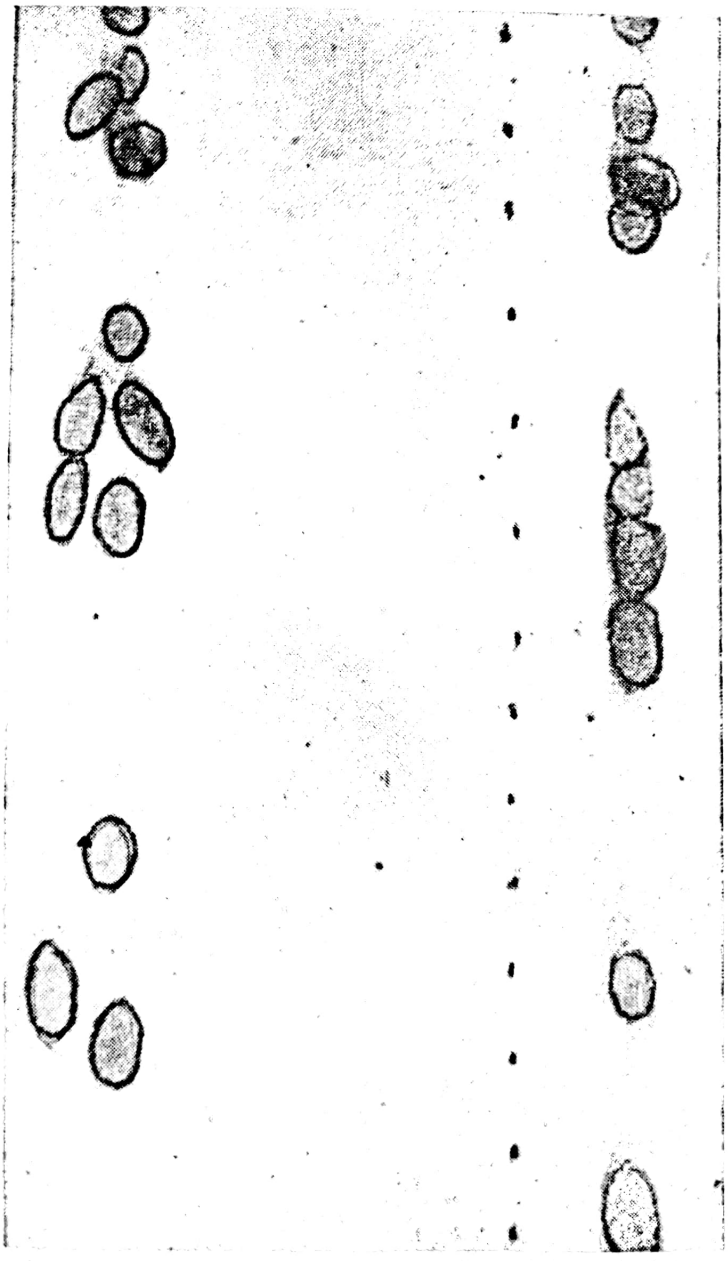


Fig. 5. Electrocromatograma aminoacizilor dintr'un hidrolizat proteinic.

In studiul metabolismelor se utilizează — pe lângă tipurile de cromatografie descrise — *radiocromatografia* hidrolizatelor unor compuși care conțin elemente „marcate" și care sunt apoi identificate după radioactivitatea lor (pete radioactive cu valori R_F caracteristice).

In anumite scopuri se utilizează în locul cromatografiei vertical descendente cromatografia

pe foi *circulare*, în care componentele unei substanțe complexe se identifică prin cercuri concentrice divers colorate care apar pe aria irigată.

PRINCIPALII ACIZI AMINAȚI

Vom descrie în acest capitol numai proprietățile și caracterele chimice ale aminoacizilor mai importanți, caracterele lor biologice urmând să le expunem în capitolul despre metabolismul lor.

I. Aminoacizii aciclici

A. Acizii monoaminomonocarboxilici

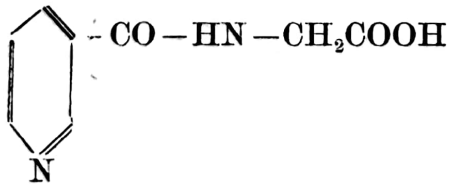
Glicocolul ($C_2H_5O_2N$) sau glicina, sau acidul aminoacetic este cel mai simplu dintre acizii aminați CH_2-NH_2-COOH. S'a extras din gelatină prin fierbere cu acid sulfuric, de unde particula „col"; particula „glico" e datorită gustului său dulce (glicos = dulce, colle = clei). In general, toți acizii aminați au gust dulce. S'a obținut sub formă cristalizată (fig. 6).

Nu intră în structura tuturor proteinelor. Poate fi sintetizat de organismul animal, deci e un aminoacid neindispensabil. E singurul acid aminat care e *optic inactiv*, nu conține C asimetric. Este folosit în organism în cursul proceselor de desintoxicare prin conjugarea sa cu diverse componente toxice rezultate din metabolismul normal sau patologic. De exemplu, prin conjugare cu acidul benzoic formează acid hipuric care se elimină prin urină:

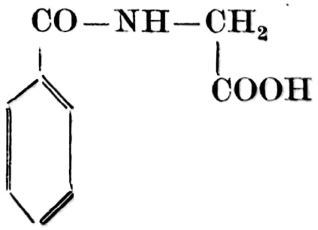
$$C_6H_5-CO-NH-CH_2COOH : (\underset{\text{clorura acidului benzoic}}{C_6H_5-COCl} + \underset{\text{glicocol}}{HNH-CH_2-COOH} \rightarrow$$

$$\rightarrow \underset{\text{acid hipuric}}{C_6H_5-CO-NH-CH_2COOH})$$

Conjugat cu acidul nicotinic, se elimină sub formă de acid nicotinuric:

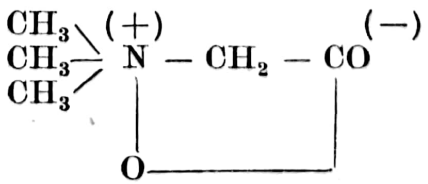


acid nicotinuric



acid hipuric

Betaina glicocolului (trimetilglicina) are analogie de structură cu colina; este produsul său de oxidație, colina fiind un aminoalcool:



Betaina glicocolului este foarte răspândită la plante (sfeclă). Nu se ştie însă dacă provine prin oxidarea colinei.

Sarcozina este metilglicocol, e un produs de degradare a creatinei din muşchi:

$$\begin{array}{l} CH_2-NH-CH_3 \\ | \\ COOH \end{array} \qquad (CH_3)H_2N^{(+)}.CH_2.COO^{(-)}$$

sarcozina sarcozina (formă de amfion)

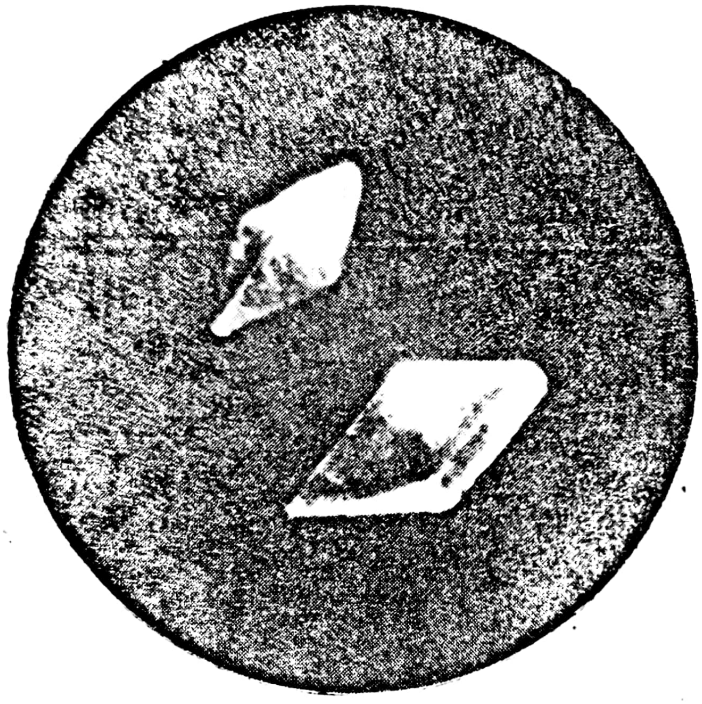


Fig. 6. Cristale de glicocol

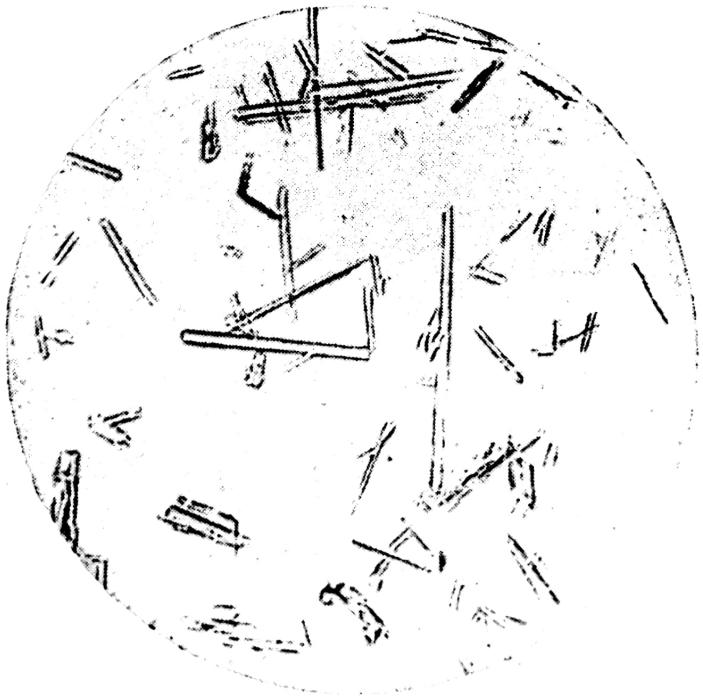


Fig. 7. Cristale de alanină

Glicocolul e o componentă a tripeptidului glutationul. Este deasemenea o componentă a acizilor biliari.

Alanina (fig. 7) este omologul imediat superior al glicocolului; este acidul α-aminopropionic $CH_3 - CH\,NH_2 - COOH$; forma *l*(+) este o componentă importantă a tuturor proteinelor. Conţine un C asimetric, există deci două forme optic active dextro + şi levo —. In natură există sub formă dextrogiră. Conform configuraţiei sale aparţine, ca toţi acizii aminaţi din natură, seriei *l*. Se cunoaşte totuşi o formă *dl*, care ar apărea în unele proteine (fibroina din mătase). Există şi o β-alanină şi e interesant că este singurul β-aminoacid întâlnit în natură, nu liber, ci ca o componentă a unei peptide cu histidina, peptidă numită *carnozina*, care se găseşte în muşchi. Un derivat important al alaninei este *acidul pantotenic*, o vitamină din

$$\begin{array}{c} CH_3 \\ | \\ H-C-NH_2 \\ | \\ COOH \end{array} \qquad \begin{array}{c} CH_2-NH_2 \\ | \\ CH_2 \\ | \\ COOH \end{array}$$

l (+) alanina alanina

grupa vitaminei B şi care

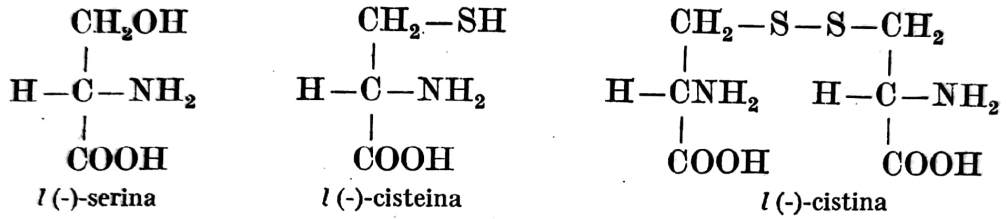
are la plante funcţia unei auxine (se ştie că auxinele sunt hormoni vegetali sau fitohormoni, care stimulează diviziunea celulară. Se găsesc în concentraţie extrem de mică numai în vârful verde al plantelor în timpul creşterii) :

$$HOCH_2-C(CH_3)_2-CHOH-CO-NH-CH_2-CH_2-COOH$$

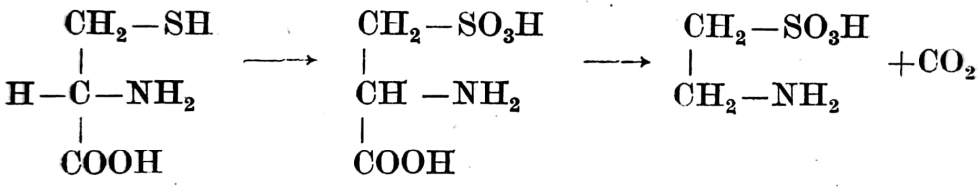
acidul pantotenic
(amida dehidroxi—2,4—dimetil—3,3 - butanoică a β-alaninei)

Prin desaminare sau transdesaminare, alanina formează acid piruvic $CH_3-CO-COOH$ şi acid lactic $CH_3-CHOH-COOH$ (acest proces are loc în ţesuturi; invers, alanina poate fi sintetizată în ţesuturi din aceşti oxiacizi).

Produse importante de substituţie ale alaninei sunt : oxiaminoacidul *serina* ; tioaminoacizii : *cisteina* şi *cistina* şi acidul *cisteinic*, din care prin decarboxilare rezultă *taurina*, o componentă a acidului *taurocolic* :

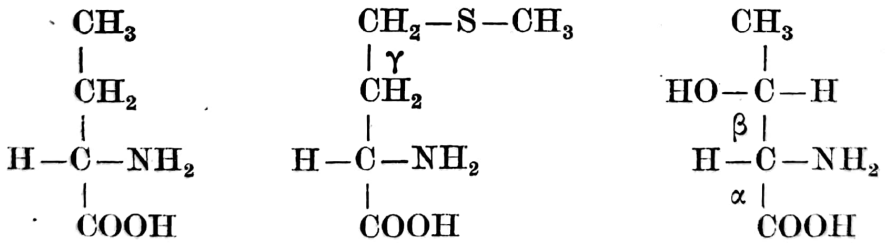


l (-)-serina — *l* (-)-cisteina — *l* (-)-cistina



cisteina — acidul cisteinic — taurina

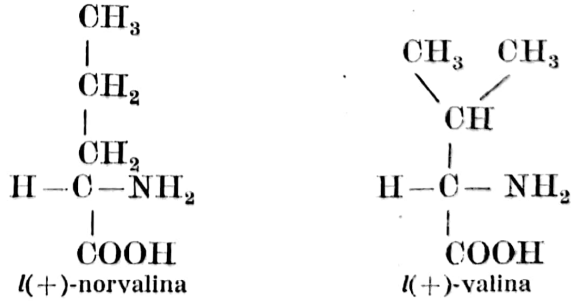
Acidul *l*(+)-aminobutiric e o componentă a câtorva proteine. Un derivat al său, însă, *metionina*, este un compus foarte important, ca şi *treonina* (acid α-amino-β-oxibutiric) :



l(+) acidul α-aminobutiric — *l*(-)-metionina (acid α-amino-γ-metiltiobutiric) — *d*(-)-treonina (acid β-oxi-α-aminobutiric)

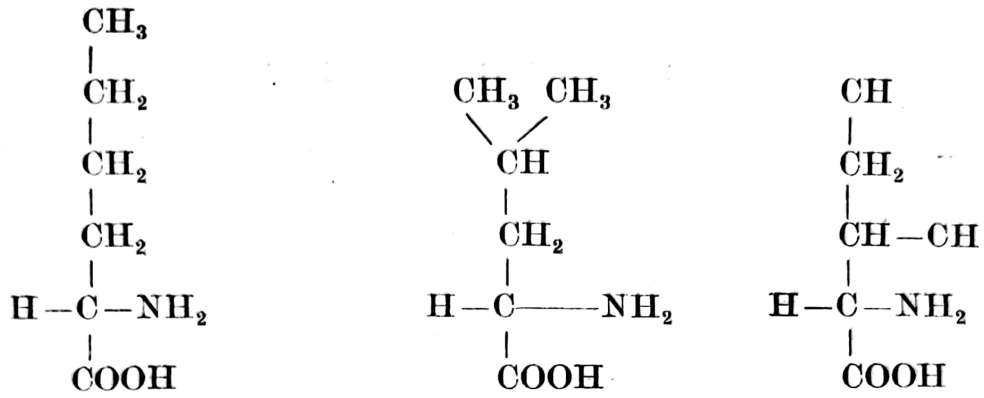
***l*(+)-Valina** ($C_5H_{11}O_2N$) şi ***l*(+)-norvalina** sunt monoaminoacizii monocarboxilici cu 5C; valina are catena ramificată, norvalina, catena normală. -*l* (+)-valina mai are şi numele de acid α-aminoizovalerianic, iar norvalina, de acid α-aminovalerianic (sunt în legătură cu acidul valerianic).

Leucinele ($C_6H_{13}O_2N$) sunt aminoacizii cu 6 C; există în



l(+)-norvalina — *l*(+)-valina

protide sub trei forme (izomere de poziție) : *norleucina, leucina* (*l* (+)-leucina) și *izoleucina* (*l*(—)-leucina) ; norleucina se mai numește acid n-α-aminocaproic ; leucina, acid α-aminoizocaproic și izoleucina, acid α-amino-β-metil-β-etilpropionic :



norleucina — leucina *l*(+) — izoleucina *l*(—)-leucina

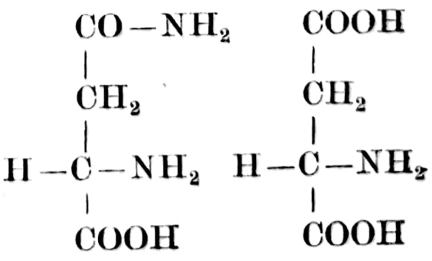
Izoleucina are 2 C asimetrici, așa că are 4 izomeri optici. Componentă a proteinelor e numai izoleucina, și anume componenta *l*(+) a izoleucinei. Leucina reprezintă în unele proteine (globina din hemoglobină de exemplu) cam o treime din molecula acesteia. In unele cazuri patologice se găsește leucină în urină (fig. 8).

B. Acizii monoaminodicarboxilici

In această grupă sunt trei aminoacizi : acidul *l*(+) asparaginic, acidul *l*(+)-glutamic și acidul oxiglutamic, aminoacizi cu 4, 5 și 6 atomi de carbon, cu caracter net acid datorită predominanței grupării COOH.

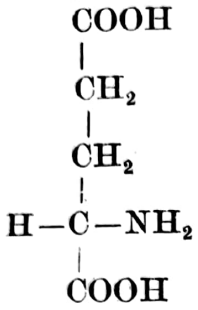
Fig. 8. Cristale de leucină

Acidul *l*(—)-asparaginic sau aspartic (C H_7O N) acid -aminosuccinic (fig. 9) există în natură sub forma unei amide, *asparagina* din spanac, care este rezervorul de azot al multor vegetale și substanța de pornire pentru multe sinteze :

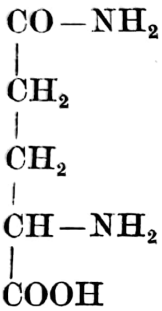


asparagina — acidul asparaginic sau aspartic

Acidul *l*(+)-**glutamic** ($C_5H_9O_4N$) (acid α-aminoglutaric) (fig. 10):



Se găsește la plante sub forma amidei corespunzătoare,



glutamina

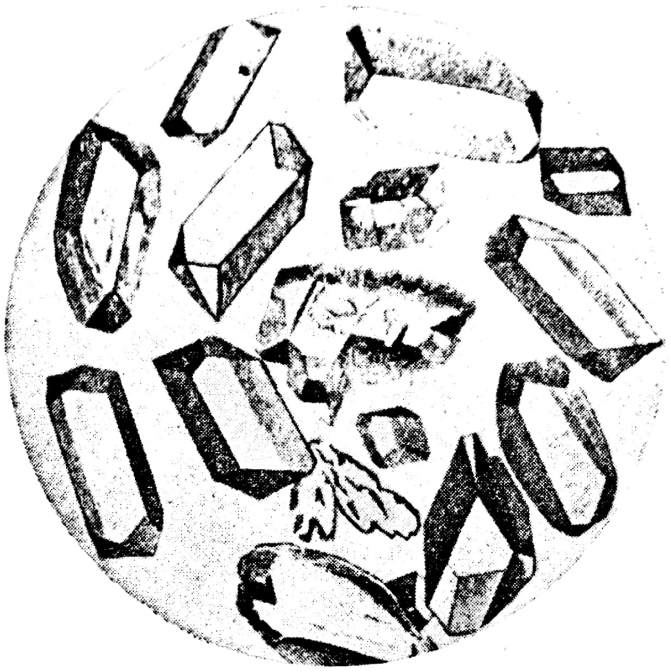
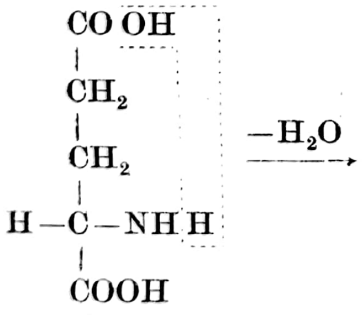
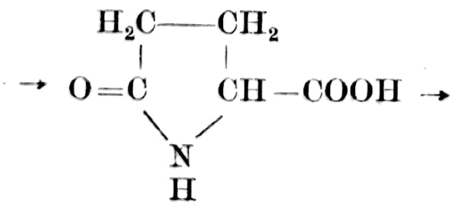


Fig. 9. Cristale de acid aspartic

monoamida acidului glutamic sau *glutamina*, care, probabil ca și asparagina, este o substanță de rezervă și servește la sinteza proteinelor din plante. Este interesant că acidul glutamic, chiar intrând în structura proteinelor, își mai păstrează una din funcțiile acide libere. E caracteristic acidului glutamic că prin încălzire trece ușor în acid pirolidincarbonic și apoi în pirol; acest lucru, pus în legătură cu sinteza pigmenților pirolici din organism, nu a fost dovedit însă în mod direct.



acid glutamic



acid pirolidincarbonic

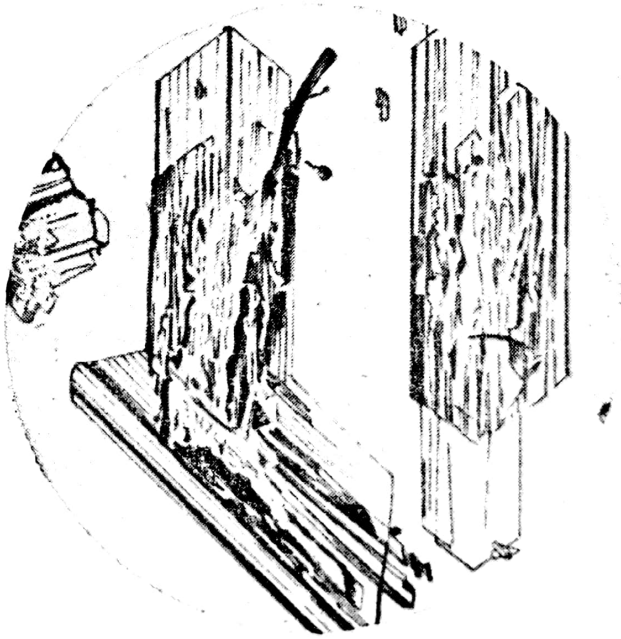
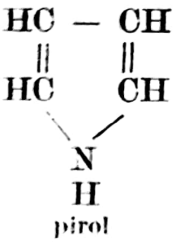


Fig. 10. Cristale de acid glutamic

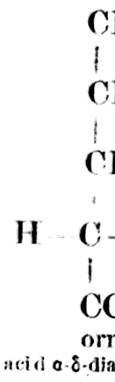

pirol

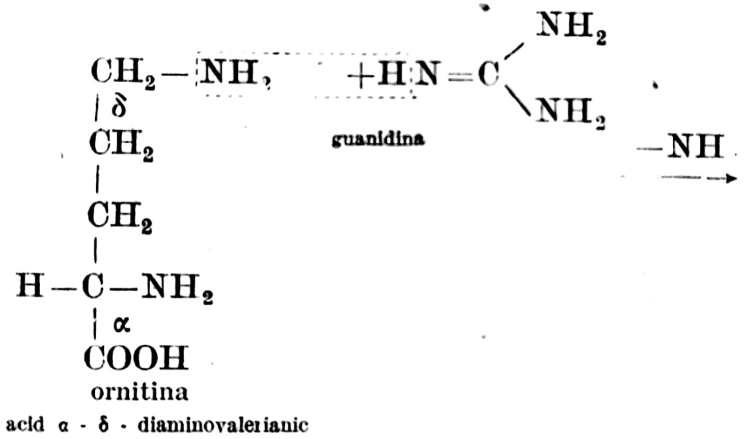
Acidul glutamic, combinat cu cisteina şi glicocolul, formează un tripeptid important, glutationul.

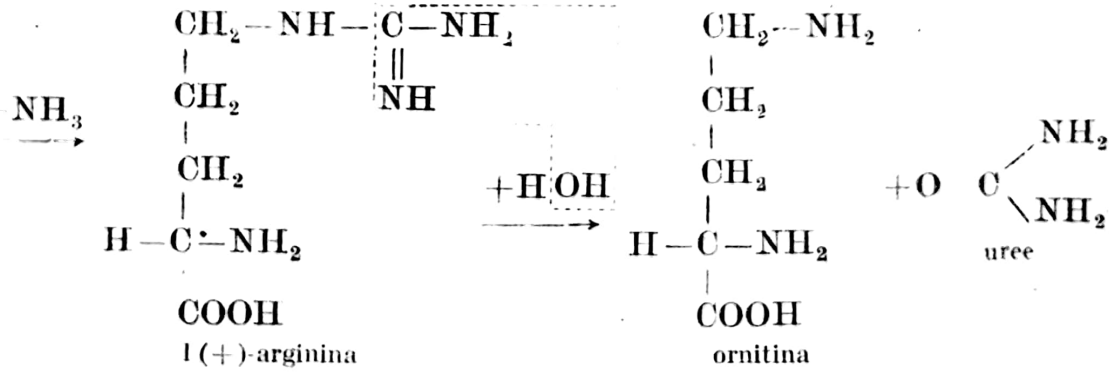
C. Acizii diaminomonocarboxilici

Importanţi în această grupă sunt compuşii cu 5 C şi 6 C, printre care ornitina, arginina şi lizina.

Ornitina ($C_5H_{12}O_2N_2$) conţine 5 atomi de carbon, două grupări aminice şi o grupare COOH, este acidul α-δ-diaminovalerianic. Nu este conţinut ca atare în proteine, ci sub forma de derivat guanidinic, *l*(+)-arginina. *l*(+)-arginina este astfel acid guanidino-α-aminovalerianic; ca şi cistina şi cistidina, este ceeace se numeşte o bază hexonică, din cauza caracterului său bazic şi a celor 6 C pe care îi conţine.

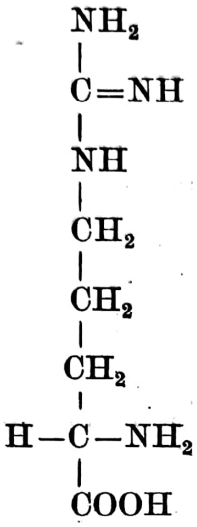

ornitina
acid α-δ-diaminovalerianic



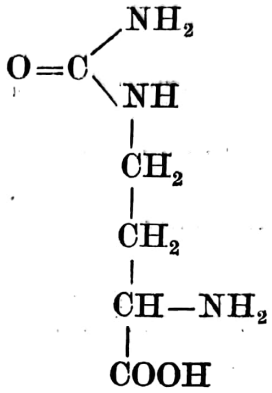


l(+)-**Arginina** ($C_6H_{14}ON_4$) acid δ-guanido-α-aminovalerianic, există în toate proteinele; unele proteine mai simple constau în majoritate din

arginină (se obține din acestea prin hidroliză). Prin hidroliză bazică, precum și sub acțiunea unei enzime care se găsește în ficat, numită arginază, arginina e transformată în ornitină și uree și se crede că prin acest mecanism se formează ureea în organism. In același timp, organismul poate sintetiza arginina din ornitină, CO_2 și NH_3, sub acțiunea aceleiași



arginina
(acid δ - guanido-α - aminovalerianic)

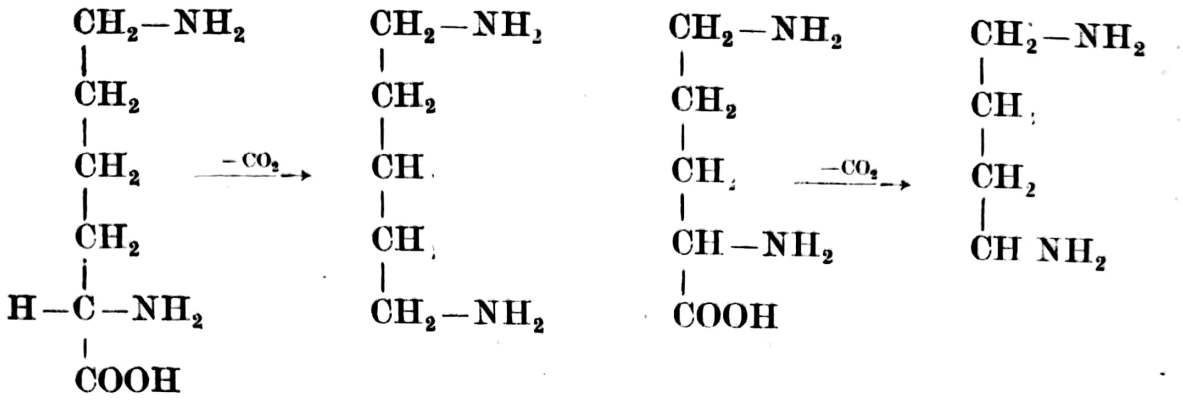


citrulina
(acid δ-carbamino - α - aminovalerianic)

enzime. Intermediar se formează *citrulina* (δ-carbaminoornitina), care prin fixarea unei noi molecule de amoniac formează arginina. Acest ciclu de transformări este foarte important din punct de vedere biologic, deoarece toate aceste substanțe au un rol în formarea ureei, constituind așa numitul *ciclu al ureogenezei*, care are loc în ficat. Vom reveni în detaliu asupra acestui mecanism important la capitolul respectiv.

l(+)-**lizina** ($C_6H_{14}O_2N_2$) acid α-ε-diaminocaproic, aparține și ea bazelor hexonice; este un acid α-ε-aminocaproic. Se găsește în toate proteinele care conțin grupări aminice libere (fig. 11). Prin decarboxilare microbiană dă o amină, *cadaverina*, după cum ornitina dă *putresceina*, amândouă fiind amine din grupa ptomainelor sau a toxinelor cadaverice.

Fig. 11. Cristale de picrat de lizină

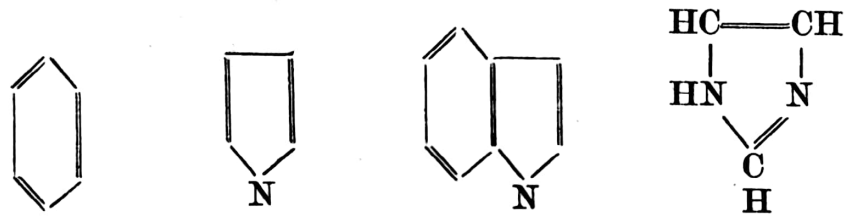


l(+)-lizina — cadaverina (pentametilendiamina) — ornitina — putresceina (tetrametilendiamina)

O altă bază hexonică, dar ciclică, e *histidina*.

II. Aminoacizii ciclici

Unii aminoacizi pot conține cicluri închise și anume ciclul benzenic, ciclul pirolic, ciclul iminazolic, ciclul indolic:



benzen — pirol — indol — iminazol

E interesant că organismul animal nu poate sintetiza direct compușii aparținând acestor grupe de acizi aminați. Aceștia sunt introduși în organismul animal odată cu alimentația sau sunt formați aici din compuși foarte apropiați ca structură, din care pot rezulta prin transformări simple.

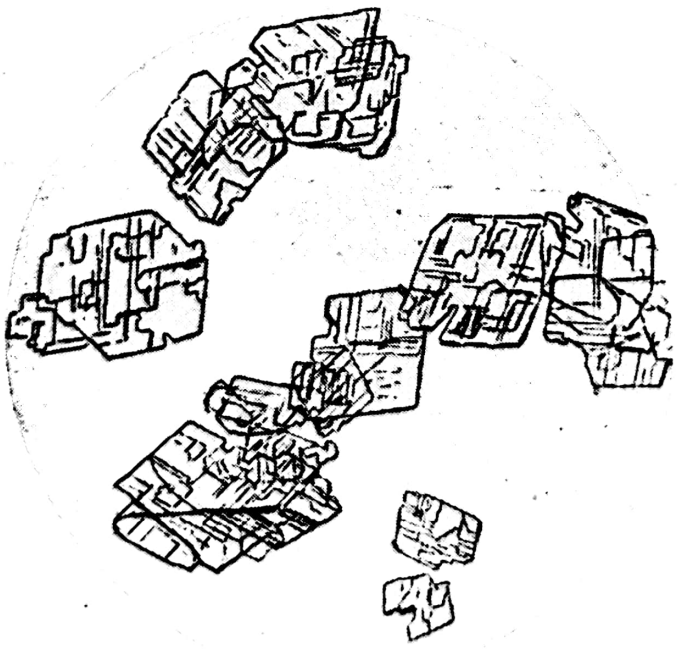
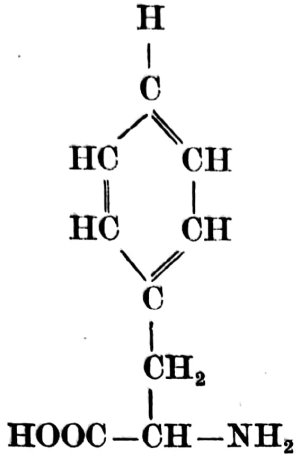


Fig. 12. Cristale de fenilalanină

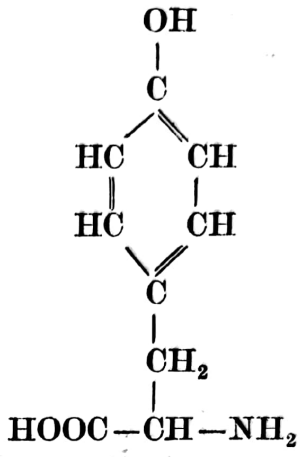
Cel mai simplu din acizii aminați derivați din benzen este:

***l*(+)—fenilalanina** ($C_9H_{11}O_2N$), acid β-fenil-α-aminopropionic, care se mai poate socoti ca un derivat ciclic al alaninei (fig. 12). Se obține prin hidroliză aproape din toate proteinele; derivatul său de oxidare este *tiro-*

zina, care e un oxiacid şi cu care se găseşte în aproape toate proteidele :



fenilalanina

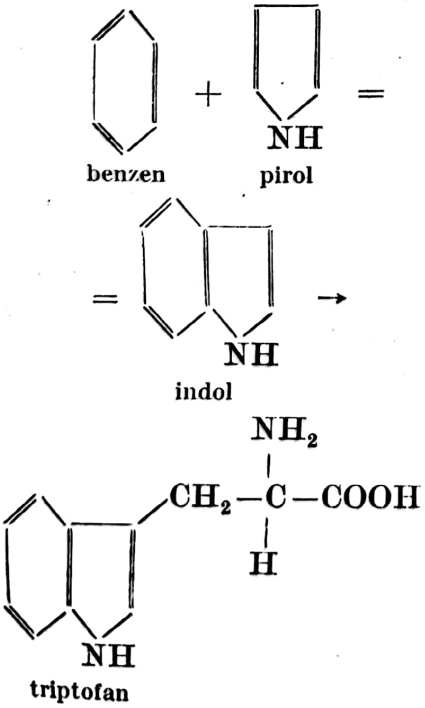


tirozina
(parahidroxifenilalanina)

l(—)-**Triptofanul** ($C_{11}H_{12}O_2N_2$), acid β-indol- α-aminopropionic (fig. 13), este şi el un aminoacid ciclic, dar cu nucleu indolic. Este unul din cei mai importanţi aminoacizi care intră în structura proteinelor naturale. In organism, lipsa lui produce turburări profunde.

A fost sintetizat prin condensarea aldehidelor şi anume pornind dela *p*-oxibenzaldehidă.

Prin hidroliza proteinelor cu acizi, triptofanul este distrus. Dă o reacţie caracteristică, *reacţia Adamkiewicz—Hopkins* : o soluţie de triptofan cu acid glioxilic (acid α-cetonic, HOOC — CH.O + H_2O) dă cu acid sulfuric concentrat, introdus în aşa fel ca să existe o pătură de separaţie între acid şi soluţie, un inel violet în zona de contact. Datorită prezenţei sale în molecula multor proteine, acestea dau reacţia de mai sus.



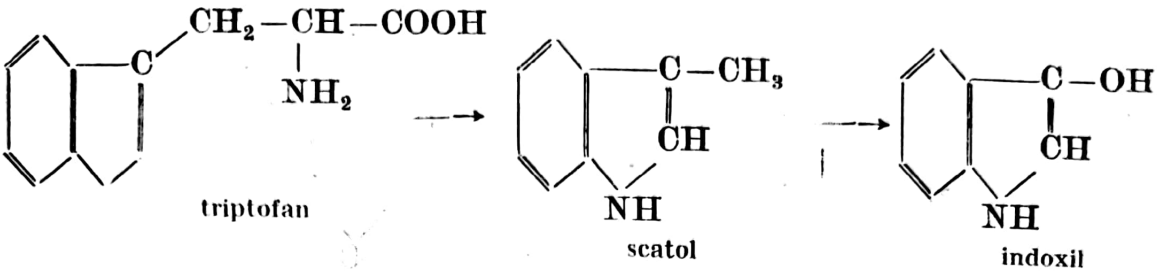
benzen pirol

indol

triptofan

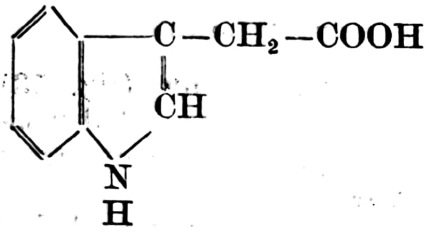
Fig. 13. Cristale de triptofan

Sub acțiunea bacteriilor intestinale, triptofanul este transformat în *indoxil* și *scatol*:



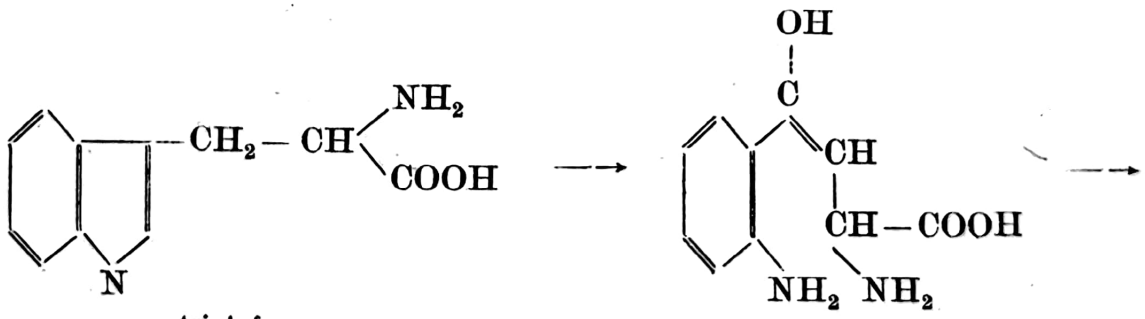
triptofan — scatol — indoxil

La mamifere, formarea de scatol și indoxil pare să fie un proces datorit exclusiv activității florei microbiene intestinale. E interesant că produsul intermediar care se formează din triptofan pentru a ajunge la scatol, respectiv indol, și anume *acidul indolilacetic*, este un *fitohormon*, o *heteroauxină*.

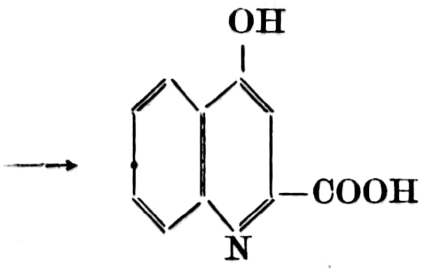


acid indolilacetic

In ultimul timp s'au găsit o serie de fapte experimentale interesante în degradarea triptofanului. S'a constatat că organismul câinelui și al iepurelui nu degradează acest aminoacid ca organismul celor mai multe dintre mamifere până la uree, H_2O și CO_2, ci după ingerare de triptofan se găsește în urina iepurelui o substanță numită *chinurenina*, rezultată din decarboxilarea și oxidarea triptofanului, iar în urina câinelui, acidul chinurenic; degradarea acestor compuși nu merge mai departe. Aceste produse rezultă din triptofan prin scindarea ciclului de 5 carboni în chinurenină și reformarea unui ciclu al chinolinei în acidul chinurenic. In urina omului se găsește chinurenină și e probabil că și aici ar rezulta dintr'o degradare a triptofanului:



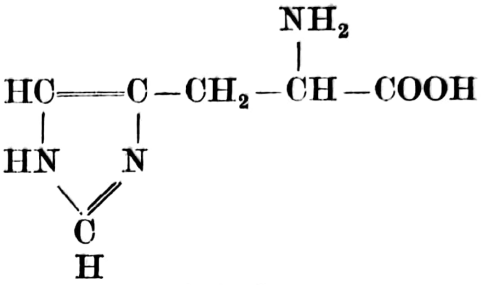
triptofan — chinurenină



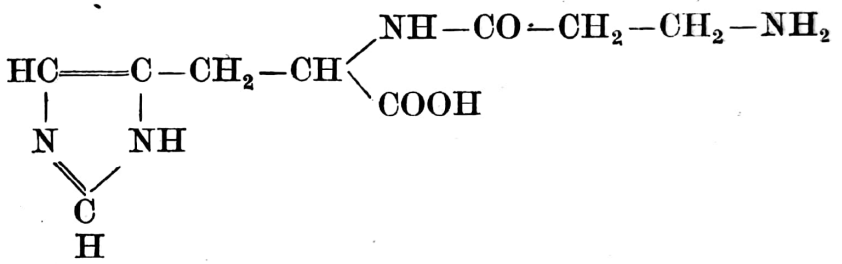
acid chinurenic
(acid 4-hidroxichinolin, 2-carboxilic)

Chinurenina are proprietatea de a influența culoarea ochilor (pigmentația ochilor) unor anumite insecte, a muștei *Drosophila melanogaster* și a unei specii de molie din făină, transformând culoarea deschisă a acestei rase în culoarea roșie a altei rase.

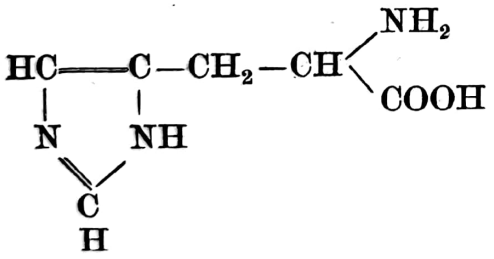
***l*(—)-Histidina** ($C_6H_9O_2N_3$) acid β-iminazolil - α-aminopropionic, conține ciclul iminazolic (un heterociclu deci), legat de un radical alanina, e deci un derivat al alaninei ca și fenilalanina și triptofanul (fig. 14). Pe când fenilalanina și triptofanul sunt acizi monoaminomonocarboxilici, histidina, lizina și arginina sunt acizi diaminomonocarboxilici și aparțin astfel „bazelor hexonice", adică acizilor aminați cu caracter bazic. Este foarte răspândită ca o componentă a majorității proteinelor. In globină, proteina din hemoglobină, e în cantitate mare (8—10%). Se găsește în țesutul muscular, constituantă a dipeptidului *carnozina* (β-alanil histidina). O amină foarte importantă rezultată din decarboxilarea histidinei este *histamina*, o amină proteinogenă, care ar juca în organism rolul unui hormon de reglare a tonusului fibrelor musculare netede; a fost izolată din ficat, se găsește în sânge, leucocite, plămân și alte organe. Se găsește în diverse medicamente extrase



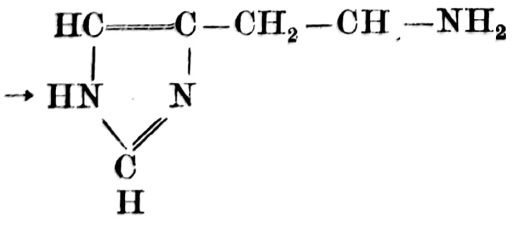
l(-)-histidina
(acid β-iminazolil - α-aminopropionic)



carnozina
(β-alanilhistidina)



histidina



histamina

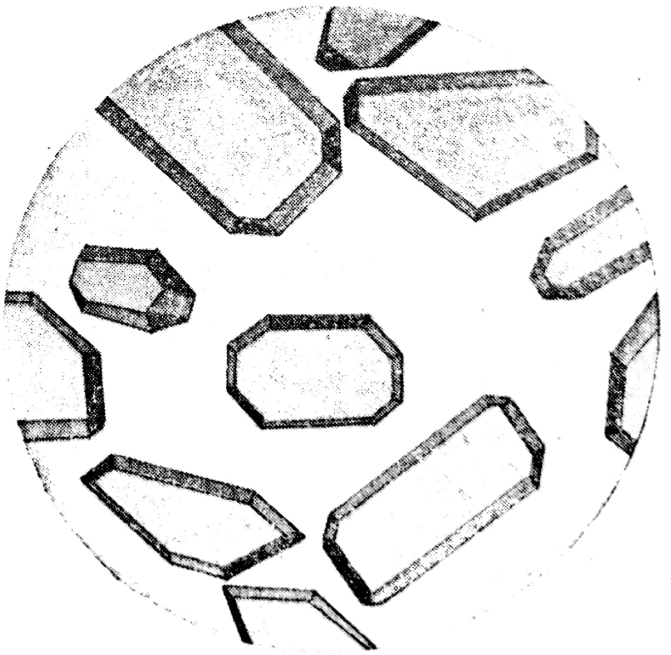


Fig. 14. Cristale de clorhidrat de histidină

din plante. Are acțiune dilatatorie asupra vaselor sanguine și s'a crezut că acțiunea razelor ultraviolete asupra pielei duce la formarea de histamină și prin acțiunea acesteia asupra capilarelor s'ar produce înroșirea pielei. Are acțiune de contracție asupra intestinului subțire.

Betaina histidinei este *hercinina* din ciuperci. Un derivat tiolic al acestei betaine, trimetilbetaina tiolhistidinei este ergotionina care se găsește în eritrocite. *l*-**Prolina** (fig. 15) este mai curând un iminoacid, deasemenea *l-oxiprolina* sau hidroxiprolina.

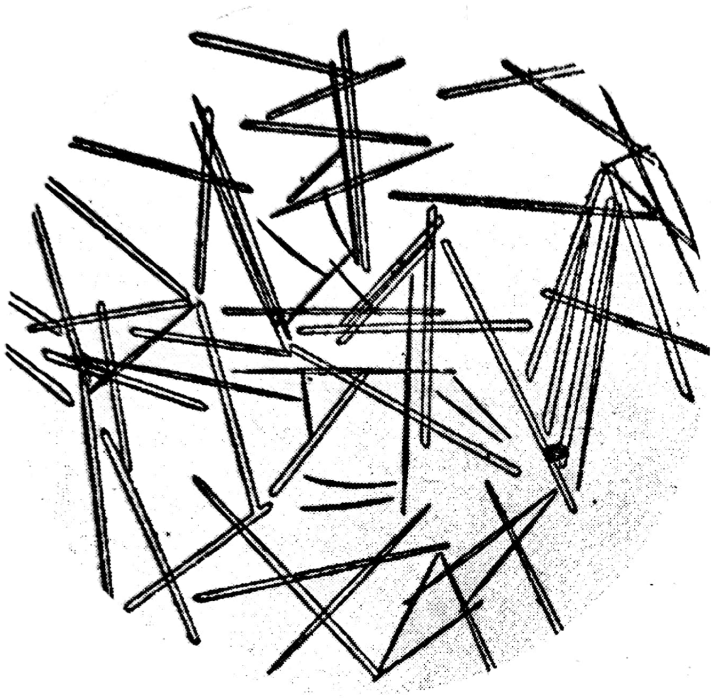


Fig. 15. Cristale de prolină

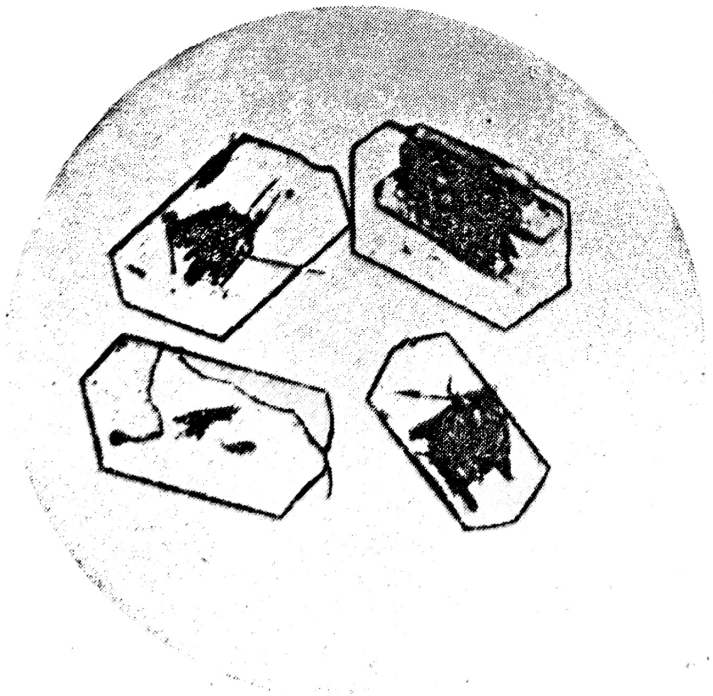
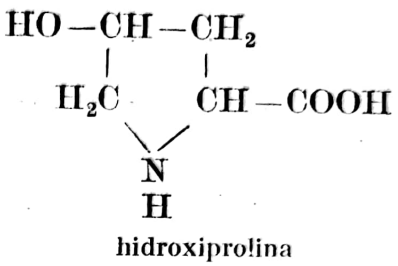
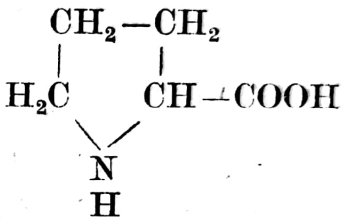


Fig. 16. Cristale de serină



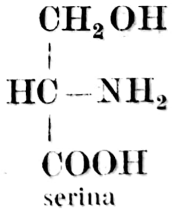
hidroxiprolina



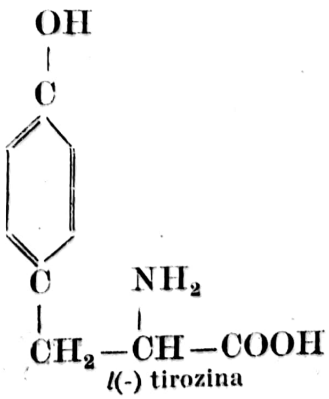
l-prolina

Oxiaminoacizii

l (—) - **Serina** ($C_3H_7O_3N$) este un acid α-amino-β-oxipropionic; a fost izolată prima oară din produse de hidroliză ale mătasei, unde se găsește asociată cu alanina. Se găsește liberă în sudoare (fig. 16).



serina



l(-) tirozina

Treonina $CH_3-\underset{\underset{OH}{|}}{CH}-\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH}-COOH$, este un oxiaminoacid care nu poate fi sintetizat de organismul animal, şi este indispensabil pentru creşterea şoarecelui tânăr (fig. 17).

l(−)-**Tirozina** ($C_9H_{11}O_3N$) este acidul p-oxifenil-α-aminopropionic; e un derivat al *l*(+)-fenilalaninei. Tirozina este deci un fenol şi este singurul fenol care intră în structura proteinelor, deaceea toate proteinele dau reacţia caracteristică fenolilor, reacţia Millon (coloraţie roşie cu un reactiv de nitrat mercuric). Cristalele de tirozină sunt caracteristice: ace lungi unite în mănunchi (fig. 18). Din tirozină derivă o serie de compuşi foarte importanţi din punct de vedere biologic. (Vom vedea acest lucru în detaliu la capitolul despre metabolismul aminoacizilor).

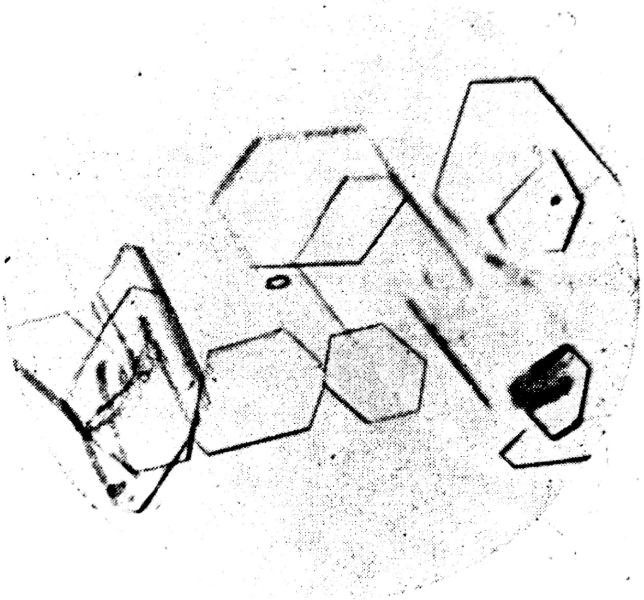
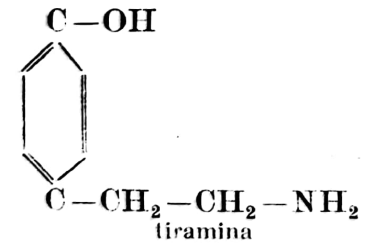
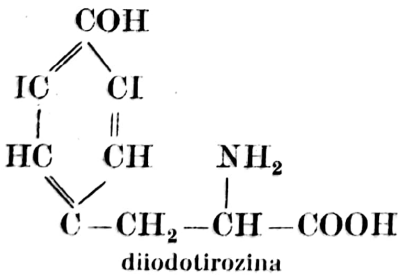


Fig. 17. Cristale de treonină

1. Prin *desaminare* duce în urma unor degradări succesive la *acidul homogentizinic*, substanţă eliminată în mare cantitate în urina indivizilor care prezintă turburări în metabolismul tirozinei (alcaptonurici).



tiramina



diiodotirozina

2. Prin *decarboxilare* dă naştere unei amine, *tiramina*, care se crede că este precursorul fiziologic al adrenalinei.

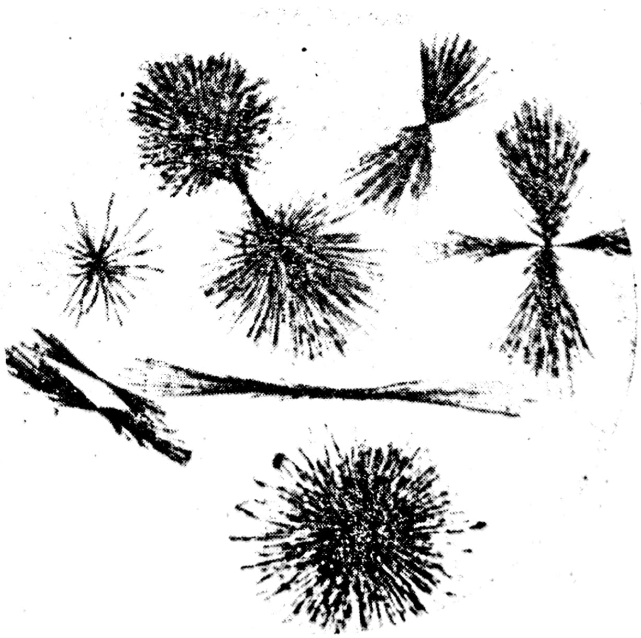
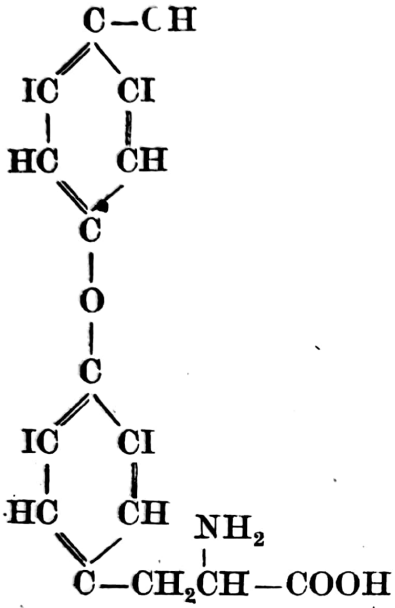


Fig. 18. Cristale de tirozină

Scanned with OKEN Scanner

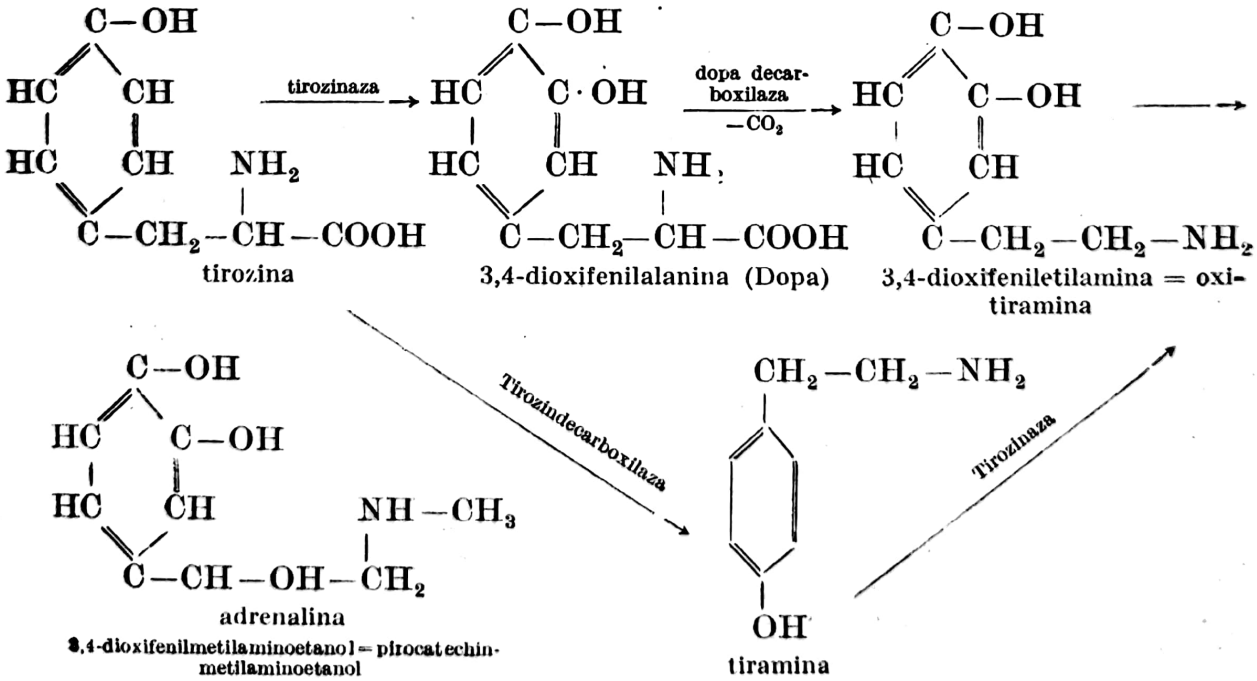
3. Din tirozină rezultă substanțe iodate foarte importante: *3,5-diiodotirozina sau acidul gorgonic*, numit astfel deoarece a fost găsit în mărgean (specia *Gorgonia*); provine din *iodotiroglobulină* și este probabil compusul din care organismul sintetizează tiroxina, hormonul glandei tiroide. Din condensarea a două molecule de diiodotirozină cu pierderea unei molecule de alanină rezultă tiroxina. Tiroxina și acidul gorgonic sunt singurele substanțe organice care conțin iod în organism.

Tiroxina este tetraiod- derivatul eterului fenilic al tirozinei; structura sa a fost confirmată prin sinteză de către C. R. Harington (1926).



tiroxina

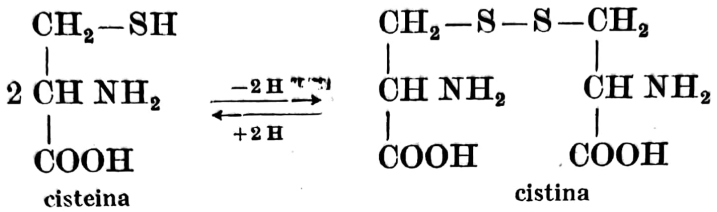
Tiroxina din natură este forma levogiră (—), care e de trei ori mai activă decât forma dextrogiră. Se știe că este hormonul secretat de glanda tiroidă. Este posibil să fie și premergătoare adrenalinei și a pigmenților melanici. Într'adevăr, tirozina este transformată sub acțiunea unei enzime, *tirozinaza*, existentă în plante, în țesuturile unor viermi, în pielea omului, într'un pigment brun-negru, *melanina*. Pigmentul din epidermul negrilor, din păr, din ochi, este o melanină și s'a emis ipoteza că ar proveni printr'un mecanism de acest tip din tirozină, nu direct, ci formând un produs intermediar de oxidare a tirozinei: 3,4-dioxifenilalanina sau Dopa. Acesta este primul produs de oxidare al tirozinei sub acțiunea tirozinazei, produsul următor și cel final fiind pigmentul roșu care devine apoi negru, melanina, a cărui structură însă nu se cunoaște încă. Se crede că adrenalina s'ar forma în organism din tirozină cu producerea intermediară de dioxifenilalanină, conform reacției:



Tioaminoacizii

Conţin funcţia tiol (—SH) sau derivaţi ai acesteia. Compuşii mai importanţi sunt :

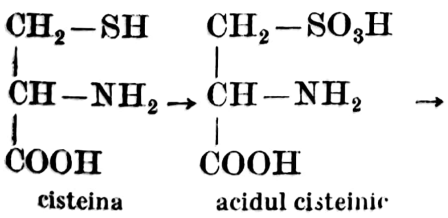
l(—)-**Cisteina** ($C_3H_7O_2NS$) sau acidul α-amino-β-tiopropionic sau tioserina. Se găseşte în special în epiderm. Există în ţesuturi sub formă liberă sau sub forma unui tripeptid, *glutationul.* Cisteina pierde uşor hidrogenul dela gruparea tiolică SH ; două molecule de cisteină prin pierderea a 2 H se unesc între ele, formând disulfidul *cistina* :

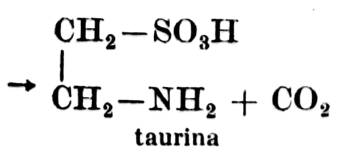


Reacţia este uşor reversibilă, cistina putând trece prin reducere în cisteină ; aşa se explică dece se izolează în ţesuturi în special cistina (fig. 19).

Reacţia reversibilă de oxidare şi reducere între cisteină şi cistină are un rol foarte important în procesele de oxidoreducere celulară, respectiv în procesul respiraţiei în celule, unde cisteina joacă rol de transportor de hidrogen. Cistina sau cisteina se poate pune în evidenţă prin proba cu sărurile de plumb. In prezenţa baritei şi a sărurilor de Pb formează un precipitat negru de SPb. Cistina e greu solubilă şi din acest motiv formează uneori calculi vezicali şi renali. Ea se găseşte în mare cantitate în scleroproteinele unghiilor, părului, pielei, unde ar avea rol de protecţie, absorbind razele ultraviolete solare.

Cisteina este materia primă din care se formează în organism *taurina* sau acidul aminoetansulfonic (care am văzut că este o componentă a acidului *taurocolic,* în care taurina e legată prin legătura amidică de acidul colic). Trecerea dela cisteină la taurină se face prin intermediul acidului cisteinic :





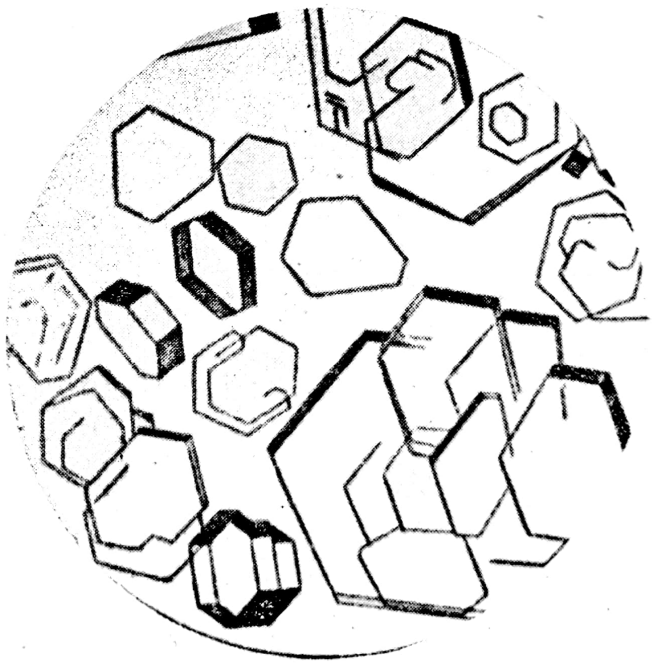
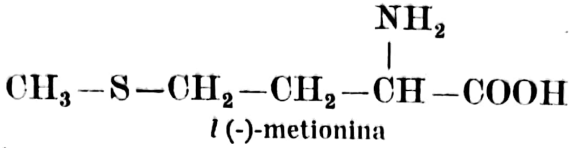


Fig. 19. Cristale de cistină

l(—)-**Cistina** ($C_6H_{12}O_4N_2S_2$) sau acidul di-β-tiol-α-aminopropionic, a fost izolată din calculi biliari. Cristalizează sub formă de plăci hexagonale. Greu solubilă în apă, solubilă în acizi și alcooli.

l(—)-**Metionina** ($C_5H_{11}O_2NS$) acid γ-metiltiol-α-amino-n-butiric :



l (-)-metionina

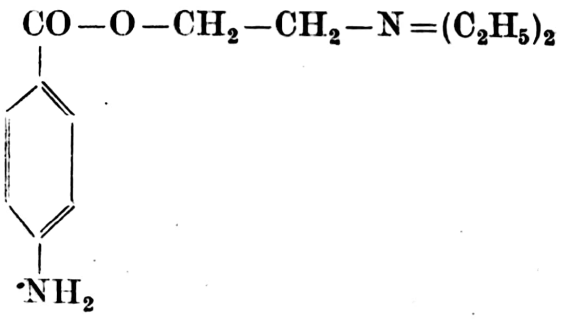
a fost izolată prima oară din cazeină (Müller, 1922). Solubilă în alcool și apă la rece, insolubilă în eter, cristalizează în plăci hexagonale. Tratată cu acid sulfuric, se transformă în acid homocisteinic, care e folosit pentru dozarea cantitativă a metioninei (se crede că acidul homocisteinic este un produs intermediar în transformarea metioninei în cistină).

Aminoacizii aromatici

Sunt acizii aminobenzoici o, m, p. Interesant este acidul p-aminobenzoic, identic cu *vitamina H'*, necesară creșterii bacteriilor. Acesta este deplasat din structura bacteriei de către sulfamide, care au și ele în moleculă un nucleu benzenic : p-aminobenzensulfon, ceeace explică în parte acțiunea curativă a sulfamidelor.

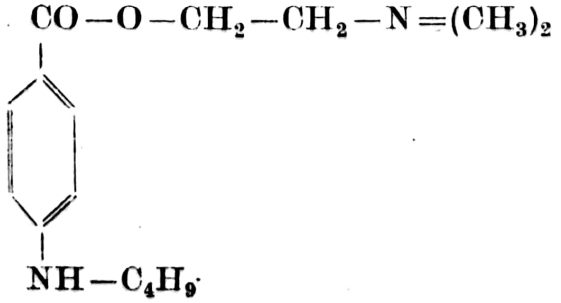
Acidul p-aminobenzoic e interesant, deoarece din el derivă anestezicii novocaina și pantocaina.

Novocaina este esterul alcoolului dietilaminoetilic cu acidul p-aminobenzoic :



novocaina

Pantocaina este esterul acidului p-n-butilaminobenzoic cu alcoolul dimetilaminobenzoic :



pantocaina

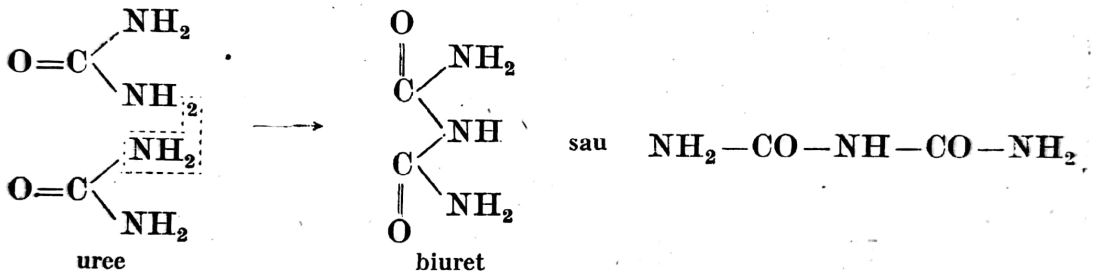
Scanned with OKEN Scanner

PEPTIDELE

Se numesc peptide compușii formați din doi sau mai mulți aminoacizi legați între ei prin legături peptidice. Legătura peptidică rezultă din eliminarea unei molecule de apă între oxidrilul grupării carboxilice a unui aminoacid și hidrogenul grupării aminice a altuia. Legătura care se stabilește astfel între doi aminoacizi vecini este legătura — CO — NH — numită și legătură peptidică. Peptidele sunt astfel *substanțe cu caracter amidic — CO — NH —*.

După numărul de aminoacizi care se combină între ei pentru a forma peptidul, pot fi di-, tri-, tetra-, penta- și polipeptidice. Polipeptidele cu un număr foarte mare de aminoacizi se numesc și peptone. Se numesc *oligopeptide*, peptidele cu un număr mic de aminoacizi (până la 5) și *polipeptide* cele cu un număr mare de aminoacizi în moleculă. E în general greu de determinat numărul de aminoacizi care intră în structura unui peptid.

Experimental se pot deosebi oligopeptidele de polipeptide cu ajutorul *reacției biuretului*, și anume : peptidele care au în moleculă mai puțin de 4 legături peptidice nu dau cu sulfatul de cupru în mediu alcalin culoarea caracteristică roșie-violacee. Această colorație este dată însă de toate peptidele cu mai mult de 5 aminoacizi în moleculă. Reacția își datorește numele compusului numit biuret, care rezultă din uree prin condensarea a două molecule de uree cu eliminarea unei molecule de amoniac :



Acest compus are 4 legături peptidice în moleculă ; or, ca un polipeptid să aibă 4 legături CO-NH trebue să conțină cel puțin 4 aminoacizi. Peptidele cu mai puțin de 4 aminoacizi în moleculă se mai numesc și abiuretice, deoarece nu dau reacția biuretului.

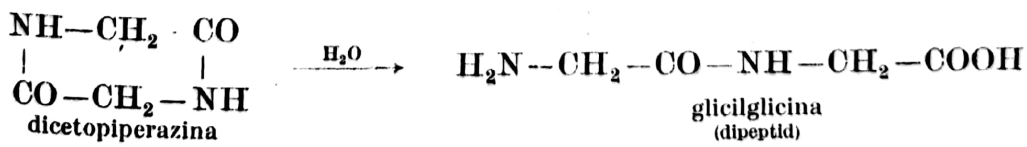
Peptonele dau o colorație mai mult spre roșu-roz decât spre violet.

Orânduirea aminoacizilor în molecula peptidelor poate varia foarte mult și cu atât mai mult cu cât sunt mai mulți aminoacizi în moleculă. Deci, fiecare peptid poate exista sub forma unui număr extrem de mare de izomeri. De exemplu, polipeptidul cu 5 aminoacizi în moleculă poate exista sub forma a 120 de izomeri teoretic posibili.

SINTEZA PEPTIDELOR

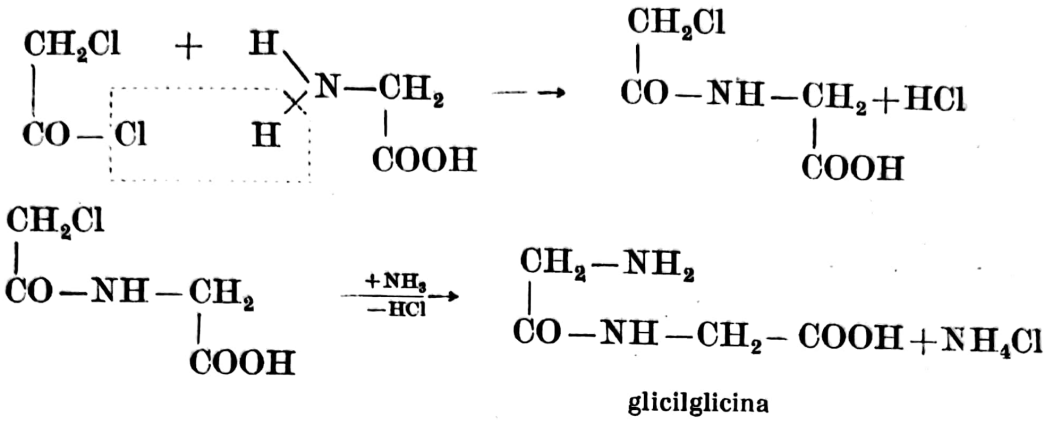
Se poate realiza în laborator :

1. Prin hidroliza parțială a dicetopiperazinelor :



Scanned with OKEN Scanner

2. Prin condensarea unui aminoacid cu clorura unui acid α-halogenat şi tratarea compusului format cu amoniac se obţine un dipeptid; din acest dipeptid, prin condensare cu alt acid organic α-halogenat şi tratare din nou cu amoniac, se obţine un tripeptid şi aşa mai departe:



glicilglicina

Cu această metodă s'a reuşit sinteza de polipeptide cu până la 19 aminoacizi în moleculă din numai 3 aminoacizi diferiţi, şi anume: *l*(—)-glicocolul, *l*(+)-alanina, *l*(—)-leucina.

3. Clorurile aminoacizilor condensate cu esterii acestora dau esteri ai dipeptidelor; prin esterificarea lor se obţin dipeptidele libere.

4. O metodă interesantă, deoarece a dus la sinteza unor dipeptide cu structură bine definită, folosită pentru studiul specificităţii proteazelor, este metoda Bergmann.

Prin condensarea aminoacizilor cu clorura de benziloxicarbonil, Bergmann reuşeşte sinteza unor peptide cu structură bine definită. Clorura de benziloxicarbonil se prepară din alcool benzilic şi fosgen în soluţie de toluol:

$$\underset{\text{alcool benzilic}}{C_6H_5-CH_2OH} + \underset{\text{fosgen}}{COCl_2} = \underset{\text{clorură de benziloxicarbonil}}{C_6H_5CH_2O-COCl} + HCl$$

Acesta reacţionează cu gruparea aminică a unui aminoacid:

$$C_6H_5CH_2OCOCl + H_2N-R = C_6H_5CH_2OCOHNR + HCl$$

şi formează un carbobenzoxiderivat al aminoacidului. Carbobenzoxiderivaţii sunt foarte stabili şi pot fi foarte uşor transformaţi în clorurile acetate corespunzătoare, care se pot condensa cu un nou aminoacid.

Un exemplu de sinteză prin această metodă este sinteza dipeptidului glicilglicina. Reacţiile sunt următoarele:

1. $C_6H_5-CH_2OCO-Cl + H_2NCH_2COOH = C_6H_5CH_2OCONHCH_2COOH + HCl$

carbobenzoxiglicocol

2. $C_6H_5CH_2OCOHNCH_2COOH \xrightarrow{PCl_5} C_6H_5CH_2OCOHNCH_2COCl$

3. $C_6H_5CH_2OCOHNCH_2COCl + \underset{\text{esterul glicocoletilic}}{H_2NCH_2COOC_2H_5} =$

$$= \underset{\text{carbobenzoxiglicilglicinetilester}}{C_6H_5CH_2OCOHNCH_2\ COHNCH_2COOC_2H_5}$$

Scanned with OKEN Scanner

4. $C_6H_5CH_2-OCO-HN-CH_2-CO-HN-CH_2-COOC_2H_5 + HCl \longrightarrow$

$\xrightarrow{\text{saponificare și reducere}} C_6H_5CH_3 + CO_2 + \underset{\text{glicilglicina}}{H_2NCH_2COHNCH_2COOH} + C_2H_5OH.$

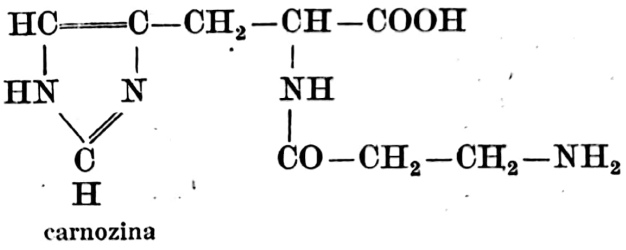
Cu această metodă s'a reuşit sinteza unor peptide conţinând aminoacizi bibazici şi dicarboxilici şi a unei serii de peptide folosite pentru studii enzimologice.

O metodă de sinteză recentă, extrem de interesantă, a fost realizată de cercetătorii sovietici Bressler şi Glinca (1947). Aceşti cercetători au arătat că la condensarea aminoacizilor are loc o scădere de volum molecular. Supunând deci aminoacizii la presiuni foarte mari, se va putea realiza o condensare a acestora în polipeptide. Lucrând la presiuni de 5—7 000 de atmosfere şi în prezenţa enzimelor proteolitice drept catalizatori, ei reuşesc să resintetizeze polipeptidele cu moleculă mare din produsele de scindare hidrolitică, rezultate din proteina de plecare, de exemplu, din gelatină, din albumină, etc. Este extrem de interesant că albumina resintetizată în aceste condiţii îşi recapătă proprietăţile specifice pe care le-a avut înainte de scindarea ei hidrolitică.

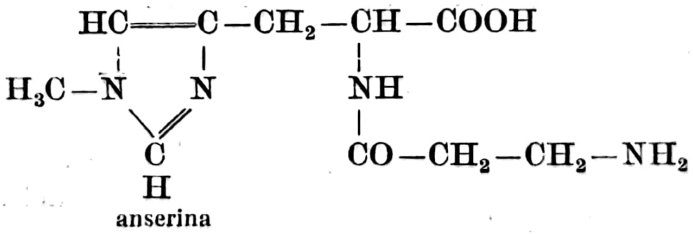
In natură se cunosc peptide naturale care rezultă din hidroliza proteinelor.

Dipeptidele

Carnozina din muşchii mamiferelor, *anserina* din acei ai păsărilor sunt dipeptide. Ambele conţin aminoacizii histidina şi β-alanina. Anserina este metilcarnozina, N din nucleul histidinei fiind metilat.



carnozina

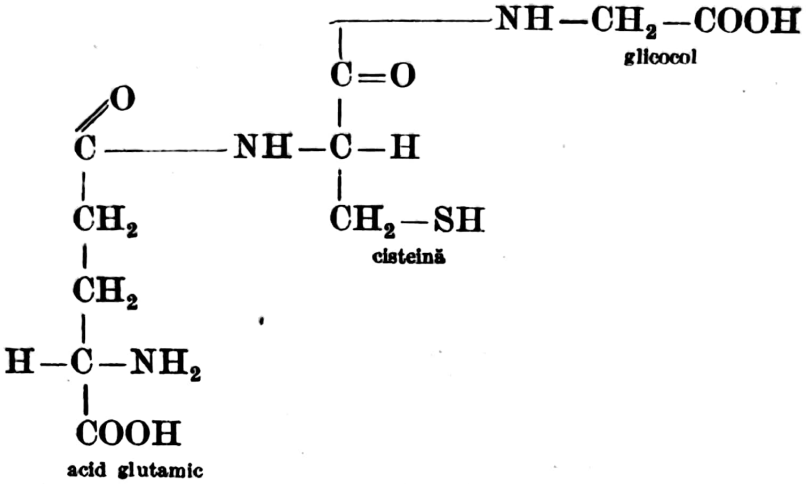


anserina

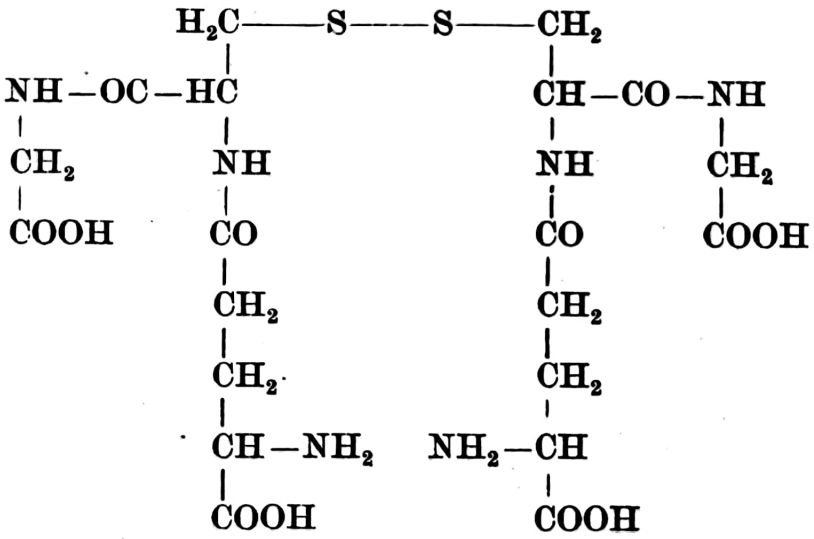
Tripeptidele

Un tripeptid foarte răspândit este *glutationul*, compus foarte important din punct de vedere biologic. A fost izolat din drojdia de bere (1921) şi ulterior identificat în aproape toate ţesuturile, în special în celulele pe cale de multiplicare. Componentele din moleculă şi structura au fost identificate cu ajutorul enzimelor proteolitice. S'a reuşit deasemenea sinteza glutationului. Este un tripeptid compus din : acid glutamic, cisteină

şi glicocol, e deci γ - glutamicisteinoglicocol. Gruparea α - amino din molecula acidului glutamic rămâne liberă şi dă toate reacţiile aminoacizilor. Gruparea carboxilică din molecula glicocolului şi gruparea α - carboxilică a acidului glutamic sunt deasemenea libere, astfel că acest compus îşi păstrează toate proprietăţile acide. Gruparea γ-carboxilică este însă blocată. Glutationul mai conţine o grupare -SH tiolică din molecula cisteinei :



glutationul
(forma redusă sau tiol)



glutationul
(forma oxidată sau disulfură)

Identificarea glutationului se face tocmai prin reacţiile caracteristice acestei grupări tiolice -SH şi anume :

1. cu hidrat de plumb la cald precipită sulfura de Pb, neagră ;
2. cu nitroprusiat de sodiu şi amoniac dă o coloraţie violetă-purpurie ;
3. cu acid fosfotungstic dă o coloraţie albastră.

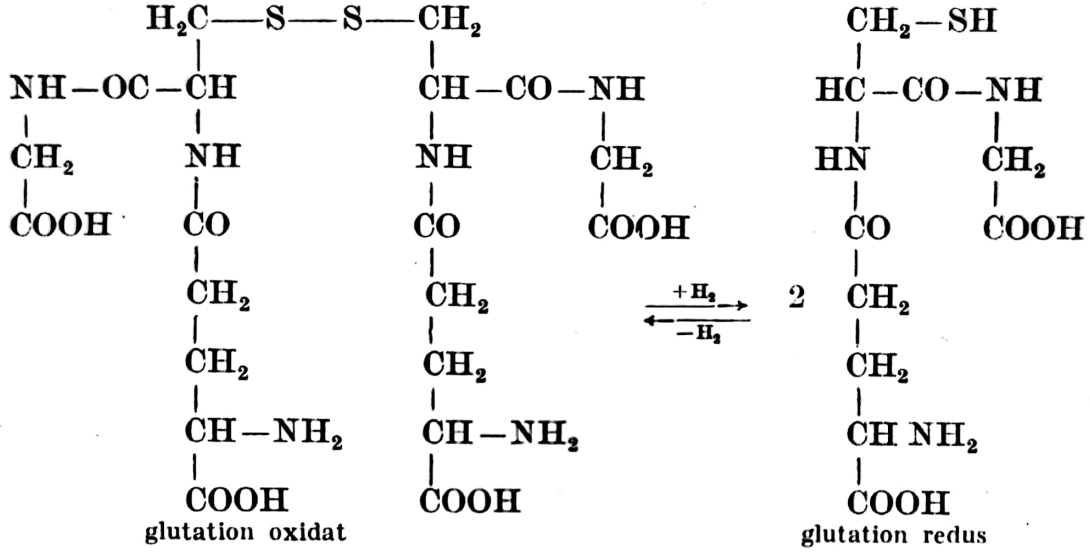
Glutationul are un rol fiziologic important, datorit în special prezenţei grupării tiolice în molecula cisteinei. Această grupare tiolică trece cu uşurinţă din forma -SH în forma disulfidică — S— S — prin cuplarea a două molecule de glutation cu pierderea simultană a celor 2 H din grupările SH.

Schematic, reacția se reprezintă astfel :

$$2\,G - SH \rightleftarrows G-S-S-G$$

G — SH corespunde formei reduse a glutationului, forma G—S—S—G, formei sale oxidate (are 2 H mai puțin).

Trecerea dela forma redusă la cea oxidată este reversibilă și, în celula vie, reacția are loc continuu în ambele sensuri. Dehidrogenarea sau oxidarea are loc în special în mediu alcalin, hidrogenarea în mediu acid. Datorită acestei treceri reversibile dela forma redusă la cea oxidată, glutationul joacă un rol important, în oxidațiile celulare, funcționând ca transportor de hidrogen în oxidoreducerea glucidelor, lipidelor nesaturate, protidelor. Constitue astfel un sistem de oxidoreducere :



Este un activator al multor enzime. Are acțiune antitoxică, de exemplu pentru CNH, blocând această grupare. Experiențe făcute pe guzgan au arătat că animalul suportă doze mult mai mari de CNH, dacă acesta este administrat împreună cu glutationul redus. Același lucru în cazul arsenicului. Veninul de Cobra, toxina tetanică și difterică sunt deasemenea atenuate de glutation.

Glutationul se găsește în sânge în special sub forma redusă. Un dezechilibru alimentar se traduce printr'o turburare a conținutului în glutation. La obezi și gutoși se constată o mare scădere a glutationului, deasemenea la diabetici. Travaliul muscular modifică concentrația glutationului sanguin.

Pentapeptidele

Un polipeptid important cu 5 aminoacizi diferiți în moleculă este antibioticul *gramicidina „S"* izolat în U.R.S.S. Este un polipeptid bacterian produs de un germen izolat din pământ. Conține în moleculă leucină, triptofan, valină, alanină, glicocol. E interesant de notat că gramicidina conține o proporție mare de d-aminoacizi.

Peptonele

Sunt tot polipeptide, dar conțin un număr mult mai mare de aminoacizi în moleculă. Din punctul de vedere al mărimii moleculei sunt inter-

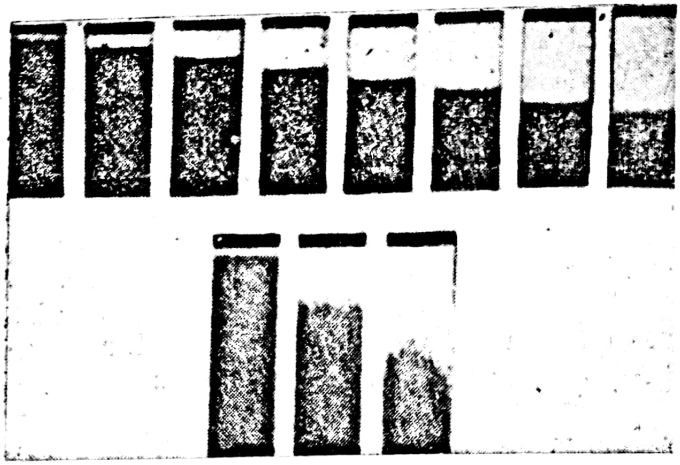


Fig. 20. Sedimentarea unei proteine la ultracentrifugă

mediare între polipeptide şi proteine. (Ar fi corespondentele dextrinelor la polizaharide).

Sunt caracterizate prin aceea că dau cu biuretul o coloraţie roşietică şi nu violacee ca proteinele sau polipeptidele.

PROTEIDELE

Proteidele se împart în două grupe mari, *holoproteide* sau mai curent *proteine*, şi *heteroproteide* sau simplu *proteide*.

Proteinele (holoproteidele) eliberează prin hidroliză numai aminoacizi. Proteidele separă în afară de aminoacizi şi grupări chimice de altă natură, care au numele de grupări prostetice.

PROPRIETĂŢI

Proteidele sunt substanţe cu moleculă foarte mare, fac astfel parte, ca şi polizaharidele, din grupa compuşilor macromoleculari sau a polimerilor înalţi; datorită acestei molecule mari, se găsesc în soluţie în stare coloidală, formează deci soluţii coloidale.

Determinarea greutăţii moleculare

Se poate face prin metode fizice şi metode chimice.

Metodele fizice sunt: 1) metoda presiunii osmotice, 2) metoda coeficientului de difuziune, 3) metoda ultracentrifugării.

Aceste diferite metode au dus la rezultate concordante între ele, dar mai precisă este metoda ultracentrifugării, care a permis determinarea greutăţilor moleculare ale multor proteide. In această metodă, soluţiile proteinelor se supun unui câmp centrifugal foarte puternic, care, acţionând asupra moleculelor din soluţie, le sedimentează; din viteza de sedimentare se poate calcula cu ajutorul unor formule matematice greutatea moleculară a particulelor. Câmpul centrifugal puternic este realizat cu ajutorul ultracentrifugelor imaginate de Th. Svedberg (Upsala). Ultracentrifugele pot atinge 40 000—120 000 turaţii pe minut, realizându-se cu ajutorul lor câmpuri centrifugale de 400 000 ori mai puternice decât ale gravitaţiei. Soluţia de proteină este introdusă în tuburi de cuarţ şi se înregistrează fotografic sedimentarea moleculelor chiar în timpul centrifugării (fig. 20).

Cu ajutorul unui calcul matematic se determină din viteza de sedimentare massa moleculei proteidice. Din determinarea greutăţii moleculare a proteinelor diverse s'a constatat faptul interesant că valoarea acestor greutăţi este totdeauna un multiplu întreg al valorii minime de 17 000. Acest multiplu poate fi 1, 2, 4, 8, 16, 24, 96, 192 şi 384.

Scanned with OKEN Scanner

Dăm un tabel al greutăților moleculare corespunzătoare unora din compușii biologici cu structură proteinică și din care reiese acest fapt, bineînțeles în limitele erorilor experimentale (v. tabelul 2).

Tabelul 2

Greutățile moleculare ale diverselor proteine și protide
(metoda ultracentrifugării)

Citocromul C	17 000	1 × 17 060
Mioglobina	17 500	„
Albumina din lapte	17 500	„
Albumina din ou	40 500	2 × 17 600 = 35 200
Albumina din ser	66 900	4 × 17 600 = 70 400
Globulina din ser	156 000	8 × 17 600 = 141 000
Edestina din cânepă	309 000	16 × 17 600 = 282 000
Hemoglobina (cal)	68 000	4 × 17 600 = 70 400
Virusul (mozaicul tabacului)	17 000 000	

Greutatea moleculară cea mai mică s'ar găsi la citocromul C (17 000). Virusurile, care sunt nucleoprotide, au greutate moleculară foarte mare (17 000 000 mozaicul tabacului, de exemplu).

Metoda chimică de calculare a greutății moleculare este bazată pe ipoteza că o anumită componentă, moleculă sau atom, se găsește în aceasta în concentrație egală cu cel puțin greutatea moleculară, respectiv atomică a componentei. De exemplu, pentru hemoglobină, Fe. Conținutul în Fe al diverselor hemoglobine este în jurul valorii de 0,335%. Știind că greutatea atomică a Fe este 55,84, vom avea 55,84 × 0,335 × 100 = 16 670, care reprezintă greutatea minimă a moleculei de hemoglobină, sau un multiplu întreg al acestei greutăți moleculare minime. Or, greutatea moleculară a hemoglobinei, determinată prin alte metode, e de aproximativ 68 000, adică de 4 × 17 000 = 68 000, ceeace arată că molecula de Hb e compusă din 4 unități de greutate moleculară de aproximativ 17 000.

A. HOLOPROTEIDELE SAU PROTEINELE

STRUCTURA PROTEINELOR

Problema structurii proteinelor este o problemă centrală a chimiei și biochimiei. Rolul proteinelor ca suport material al vieții impune cunoașterea structurii statice și dinamice a acestor componente de primă importanță.

— Prima etapă în studiul structurii chimice a proteinelor a fost stabilirea compoziției elementare a moleculei acestora.

— A doua etapă a fost identificarea aminoacizilor ca elemente structurale ultime rezultate din desfacerea hidrolitică a proteinelor.

— A treia etapă este marcată prin punerea în evidență a legăturii peptidice ca formă principală de legătură între aminoacizii componenți ai moleculei proteinice.

— A patra etapă este dirijată de ipoteza naturii polipeptidice a moleculei proteinice.

— A cincia etapă de ipoteza naturii dicetopiperazinice a moleculei proteinice.

— A șasea etapă și cea actuală îmbină teoria polipeptidică cu cea dicetopiperazinică și înlătură o serie întreagă de contradicții legate de acceptarea integrală a fiecăreia din aceste ipoteze în parte.

Vom detalia în limite restrânse fiecare din aceste etape de cercetare.

Scanned with OKEN Scanner

1. Compoziţia elementară a proteinelor

Proteinele conţin în moleculă C, H, O, N, S, adesea P, uneori Fe, Cu, etc. Proporţia este următoarea :

C : 50—55 %	N : 15—19 %
H : 6,8—7,7 %	S : 0,5—2,0 %
O : 19—24 %	

Caracteristică este valoarea medie a N, deaceea se obişnueşte să se calculeze concentraţia în proteine a unei soluţii date, multiplicând valoarea lui N cu factorul 6,25 $\left(\text{factor dedus din relaţia : proteină} = \text{N} \times \frac{100}{16} \right)$.

2. Identificarea aminoacizilor ca ultime unităţi structurale rezultate din desfacerea hidrolitică a proteinelor a fost posibilă mulţumită hidrolizei acide şi alcaline a acestora. Prin hidroliză totală, proteinele eliberează aminoacizi. Prin hidroliză parţială, acidă sau alcalină, şi prin hidroliză enzimatică se obţin însă din molecule de proteină o serie de compuşi intermediari cu greutăţi moleculare variabile, în funcţie de condiţiile de hidroliză, şi anume, peptone şi peptide.

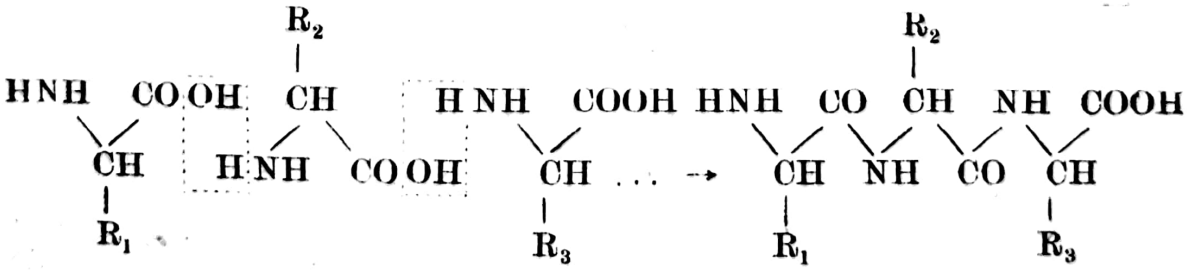
Aminoacizii care intră în componenţa proteinelor naturale aparţin seriei *l*(+) sau *l*(—). Formele *d* se găsesc extrem de rar. Se citează prezenţa acestora în capsula unor bacterii (de exemplu, capsula *B. anthracis* este formată dintr'un polipeptid de *d*-acid glutamic), în ţesuturile canceroase (Kögl), în structura unor antibiotice (gramicidina, penicilina).

Până acum s'au izolat aproximativ 30 de aminoacizi diferiţi care pot intra în structura diverselor proteine. Numărul, natura şi modul de orânduire ale acestora în moleculă variază dela o proteină la alta. Posibilităţile infinit de numeroase de combinare a aminoacizilor în molecula proteinică explică în anumită măsură imensa varietate a proteinelor în natură.

3. Legăturile dintre aminoacizii din molecula proteinelor sunt **legături de tip peptidic**, de tip amidic — CO — NH —.

Aceasta rezultă din faptul că, ori de câte ori se eliberează prin hidroliză o grupare aminică, se eliberează simultan şi o grupare carboxilică ; or, singura legătură care poate elibera concomitent ambele grupări este legătura peptidică — CO — NH —.

Legătura peptidică se stabileşte prin eliminarea unei molecule de apă între gruparea carboxilică a unui aminoacid şi gruparea aminică a aminoacidului vecin. Prin acest mecanism se pot condensa aminoacizii între ei şi, în raport cu numărul acestora, se obţin : dipeptide, tripeptide, tetrapeptide... polipeptide şi proteine :



Fragment dintr'un lanţ peptidic

(R_1, R_2, R_3.... radicali diferiţi şi caracteristici fiecărei proteine)

Scanned with OKEN Scanner

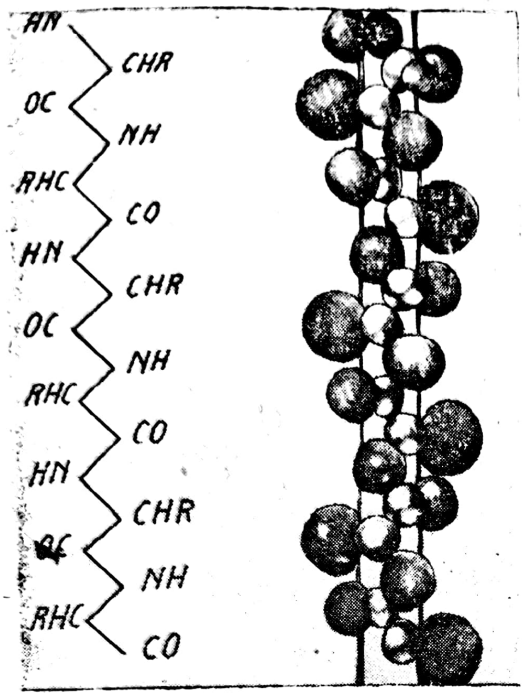


Fig. 21. Lanț polipeptidic extins

Cea mai folosită metodă de studiu în cercetarea compoziției chimice a proteinelor a fost metoda hidrolizei acide, alcaline și enzimatice. Cu ajutorul acestei metode s'a putut determina :

1. care sunt aminoacizii care intră în structura unei proteine date;
2. care este proporția diverșilor aminoacizi din molecula proteinică, adică frecvența cu care apare fiecare aminoacid în această moleculă;
3. care este poziția unui anumit aminoacid în molecula proteinei.

Acest din urmă punct poate fi lămurit în special cu ajutorul hidrolizei enzimatice (sub acțiunea enzimelor proteolitice). Hidroliza enzimatică duce la scindarea legăturilor peptidice numai în acele puncte ale moleculei unde există anumiți aminoacizi.

Astfel, pepsina nu acționează decât acolo unde există tirozină sau fenilalanină, tripsina numai asupra proteinelor care conțin arginină și lizină (aceste fapte vor fi expuse mai în detaliu la capitolul enzimelor).

Grație acestei caracteristici, hidroliza enzimatică indică poziția pe care un anume aminoacid o ocupă în catena moleculei proteinice.

Hidroliza acidă, alcalină și enzimatică a proteinelor indică astfel natura, numărul și, eventual, poziția unui anumit aminoacid în molecula acestora, indică felul lor de orânduire pentru a forma proteina intactă cu caracteristicile sale chimice, fizice, fizico-chimice și, în special, biologice.

Dece keratina este atât de rezistentă la acțiunea acizilor?

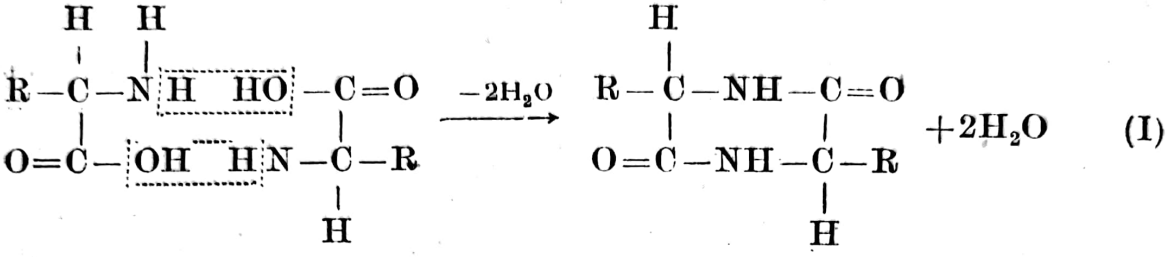
Dece miozina are rol în contracția musculară, dece unele proteine au funcție enzimatică, dece virusurile sunt toxice ....etc.....etc.... ? S'au emis o serie de ipoteze asupra orânduirii aminoacizilor în molecula proteinică, ipoteze care să explice comportarea acestor componente de importanță fundamentală.

4. **Teoria polipeptidică** a fost formulată prima oară de Hofmeister (1902) și Fischer (1903) și desvoltată amplu de acesta din urmă. După Fischer, molecula proteinică este formată din catene polipeptidice foarte lungi, constituite din anhidride ale aminoacizilor, peptidele fiind numai fragmente mai scurte ale acestor catene (fig. 21). Ipoteza a fost susținută prin experiențele de sinteză ale unor peptide constituite din mai mulți aminoacizi (de exemplu : octodecapeptidele) și prin rezultatele obținute de hidroliza moleculei proteinice cu formare de produse intermediare cu caracter peptidic (di-tri-tetra-, etc.... peptide). (fig. 22). Determinarea lungimii lanțului peptidic din molecula proteinei nu a fost posibilă; datele experimentale nu indică prezența unor catene lungi, ci a unor polipeptide multiple, fiecare cu greutate moleculară relativ mică.

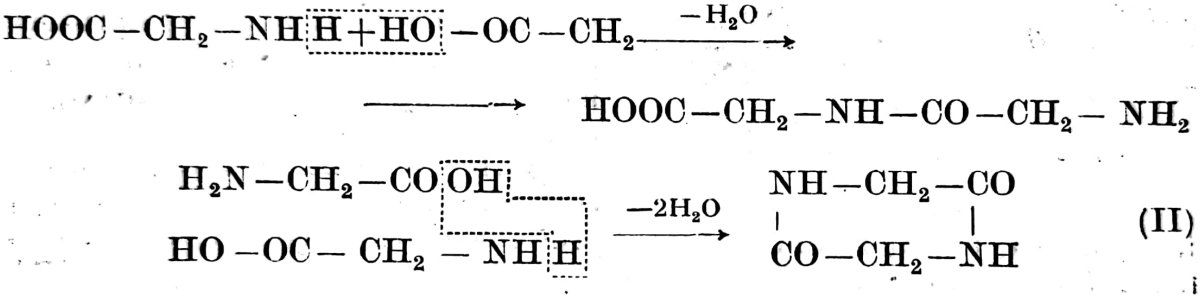
Scanned with OKEN Scanner

Ipoteza lanțului polipeptidic de lungime mare nu explică diferențierea biologică a diverselor proteine, ceeace constitue un argument important împotriva acestei interpretări.

5. **Teoria dicetopiperazinelor** este reprezentată de școala lui Abderhalden, Zelinschi și Sadicov. Această ipoteză sugerează că proteinele sunt formate din unități dicetopiperazinice îmbinate între ele prin valențe secundare. Dicetopiperazinele pot rezulta prin condensarea a doi aminoacizi cu eliminarea unei molecule de apă (I) sau prin ciclizarea unui dipeptid (II):



(I)



(II)

Dicetopeptidele sunt astfel anhidride ciclice ale aminoacizilor. Ipoteza unui lanț exclusiv dicetopiperazinic în molecula proteinei era susținută de câteva fapte experimentale, și anume: identificarea unor mari cantități de dicetopiperazine în hidrolizatele proteinelor, reacțiile de culoare ale proteinelor datorite prezenței acestora (reacția cu acidul picric, de exemplu). Această ipoteză explica unele din proprietățile unor anumite tipuri de proteine, în special al celor de protecție (keratine, fibroina din mătase) la care cercetări röntgenografice indică prezența unei dicetopiperazine și care au o mare rezistență față de acțiunea enzimelor proteoli-

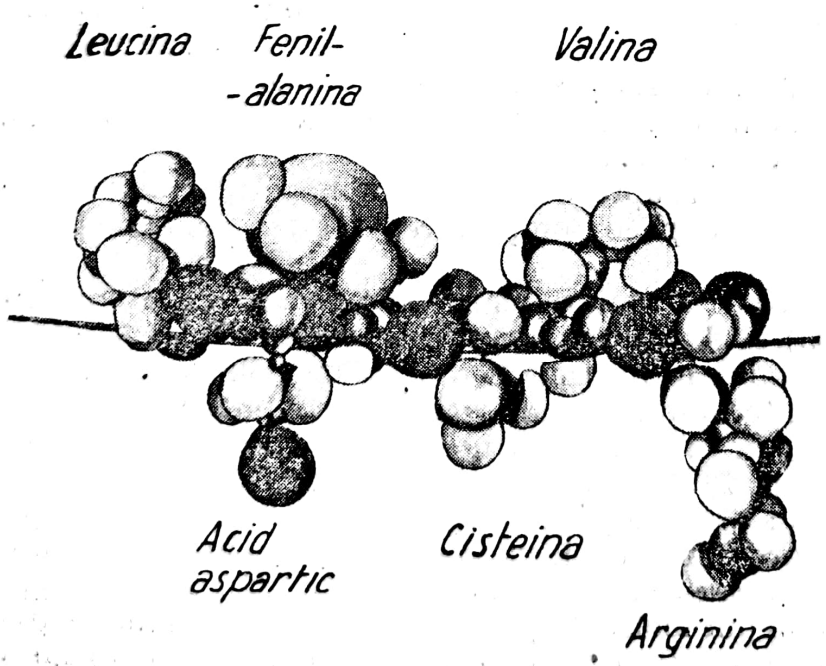


Fig. 22. Fragment dintr'o catenă polipeptidică total extinsă

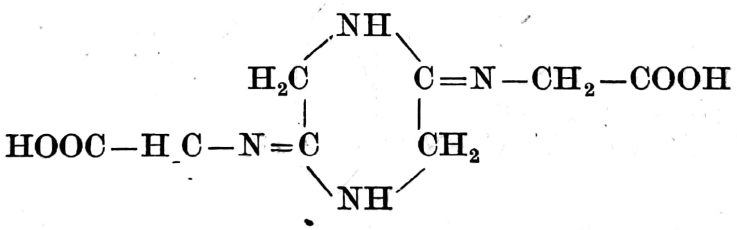
tice. Ipoteza nu justifică însă o serie de alte proprietăți importante și, în special, nu justifică hidroliza proteinelor sub acțiunea enzimelor proteolitice, dicetopiperazinele nefiind atacate de aceste enzime. O serie de fapte experimentale nu erau astfel în concordanță nici cu teoria polipeptidică ce admitea existența unor catene lungi în molecula proteinei, și nici cu existența unor catene exclusiv dicetopiperazinice. Faptele experimentale impuneau o nouă ipoteză asupra structurii proteinelor, care să înlăture contradicțiile legate de fiecare din interpretările de mai sus.

Noua interpretare asupra structurii proteinelor îmbină teoria polipeptidică cu teoria dicetopiperazinică și explică în mare măsură comportarea diverselor proteine.

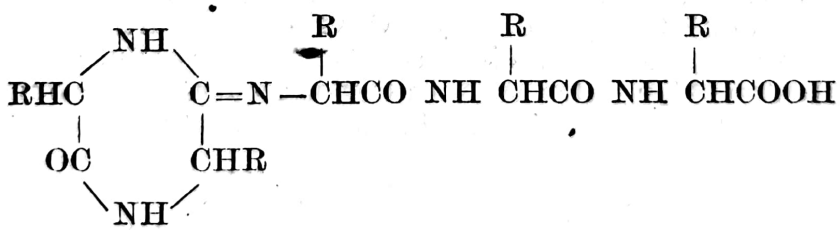
Posibilitatea de a prepara enzime proteolitice sub o formă de o puritate avansată și posibilitatea preparării prin sinteză chimică a unor polipeptide cu structură bine definită și care să fie folosite drept substrat al acestor enzime au permis studii mai profunde asupra structurii proteinelor și au dat o bază experimentală interpretărilor noi.

6. **Teoria structurii amidinice** a proteinelor a fost formulată de N. I. Gavrilov (1947) și îmbină concepția structurii peptidice cu cea a structurii dicetopiperazinice, explicând astfel comportarea diverselor proteine.

După Gavrilov, proteinele ar avea o microstructură și o macrostructură. Micromolecula ar avea o greutate moleculară mică (1 500—3 000), fiind analoagă compușilor de tipul peptonelor; aceste micromolecule sunt eliberate, sub acțiunea enzimelor proteolitice de tipul pepsinei, tripsinei, etc. Macromolecula rezultă din condensarea unui mare număr de micromolecule care, după Gavrilov, sunt formate dintr'un ciclu dicetopiperazinic legat de două catene tripeptidice, legăturile dintre catene și ciclu fiind de un tip special, *legături amidinice*:



Legătura amidinică dintre dicetopiperazine și polipeptide



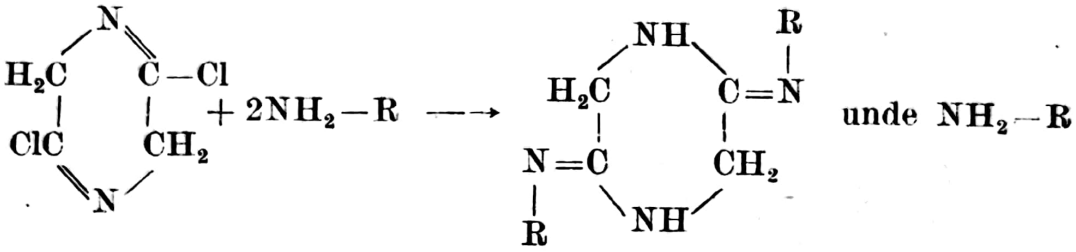
Dicetopiperazină la care este fixat un tripeptid prin legătură amidinică

Incercări de a determina lungimea catenei polipeptidice cu ajutorul reacției biuretului, caracteristică atât proteinelor, cât și peptonelor, indică tripeptidul ca fragment al structurii acestora. Acest fapt a fost dedus din spectrul de absorbție al complecșilor cu cupru ai acestor componente.

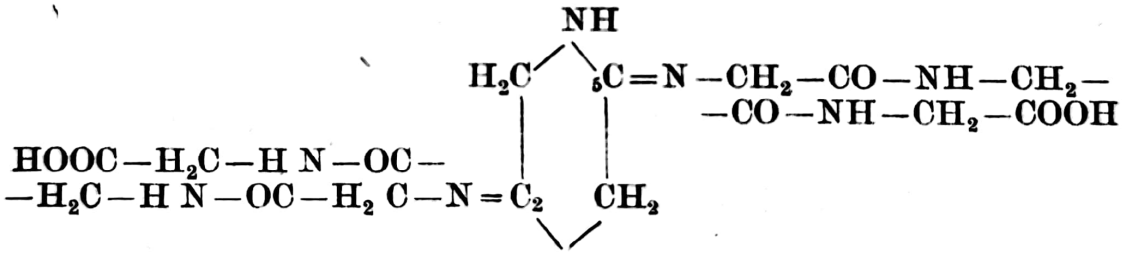
Pentru dozarea dicetopiperazinelor în molecula proteinelor s'a folosit o metodă bazată pe reducerea electrolitică a dicetopiperazinelor (N. I.

Scanned with OKEN Scanner

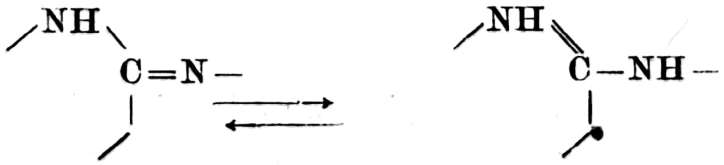
Gavrilov şi A. V. Coperina) în anumite condiţii speciale. Cu această metodă s'a constatat că molecula gelatinei conţine N dicetopiperazinic 27,6% din N total, albumina din ser 20,4%. Nucleul elementar al proteinei ar fi astfel format dintr'un ciclu dicetopiperazinic cu două tripeptide. Legătura dintre diversele unităţi elementare ar fi o legătură de tip amidinic; existenţa acestei legături pare să fie confirmată de faptul că enzimele proteolitice pot desface o asemenea legătură, dar nu pot desface dicetopiperazinele. Ipoteza lui Gavrilov mai este susţinută de faptul că acest autor şi colaboratorii săi au reuşit să sintetizeze un compus având în acelaş timp caracter peptidic şi dicetopiperazinic, prin condensarea diclordihidropiperazinei cu esterii unor aminoacizi sau ai unor dipeptide şi tripeptide:



poate fi esterul etilic al glicocolului $NH_2-CH_2-COOC_2H_5$ sau esterul etilic al alaninei $NH_2-\underset{\underset{CH}{|}}{CH}-COOC_2H_5$. S'a reuşit sinteza model a dicetopiperazinei cu diglicilglicina (Gavrilov şi Achimova):



în care nucleul de bază este constituit dintr'o grupare ciclică de piperazină, de care sunt legate, la carbonul 2 şi 5, prin legături amidinice cu azotul α-aminic, cele două tripeptide. După Gavrilov legătura amidinică joacă rol de grupare funcţională mobilă a moleculei proteinice, grupare prin intermediul căreia s'ar putea stabili ulterior legături între micromolecule prin deplasarea legăturii duble amidinice din catena laterală în ciclu:

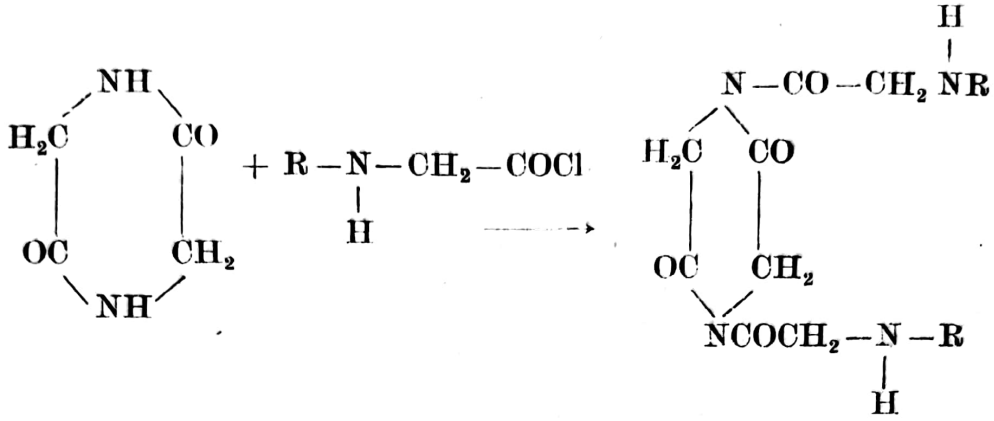


Faptul că aceste legături amidinice pot fi scindate de enzimele proteolitice (pepsina) pledează pentru posibilitatea unei legături de acest tip.

Pornind dela dicetopiperazine acilate cu clorurile prepară dicetopiperazine substituite, la azot radicalii aminoaciclici folosiţi fiind ftalilglicilul, toluensulfoglicilul şi benzilsulfoglicilul şi realizează prin sinteză un frag-

Scanned with OKEN Scanner

ment structural analog cu cel atribuit de Gavrilov microstructurii proteinei (1947); macrostructura este rezultatul polimerizării unui foarte mare număr de micromolecule, unite probabil tot prin legături amidinice.



unde $R = C_6H_4(CO)_2$ sau $CH_3 - C_6H_4SO_2$ sau $C_6H_5CH_2SO_2$

In legătură cu frecvența aminoacizilor de-a-lungul catenei peptidice, Bergmann și Niemann admit că fiecare aminoacid din molecula proteinei apare periodic de-a-lungul catenei, că este deci distribuit în întreaga catenă peptidică la intervale constante, revenind în moleculă cu o anumită frecvență. Aceasta este reprezentată printr'un număr întreg și caracteristic. Diverșii aminoacizi se succed într'o anumită ordine, repetându-se la intervale anumite în moleculă și realizând astfel o structură periodică. De exemplu, pentru gelatină ar exista o moleculă de tipul:

$$- G - P - X - G - X - X - G - P - X - G - X - X -$$

unde G = glicocolul, P = prolina, X = un aminoacid oarecare. Bergmann admite că proteinele sunt formate din 144 aminoacizi sau un multiplu întreg al acestei valori; periodicitatea fiecărui aminoacid din catena peptidică se regăsește în molecula proteinică și acest lucru ar determina o anumită organizare fixă a întregii molecule.

Faptele experimentale nu au putut confirma însă această ipoteză. Cercetătorii sovietici Bressler și Talmud (1944) susțin o cu totul altă ipoteză: combinarea diverșilor aminoacizi nu s'ar face într'o ordine absolut fixă, iar apariția lor la intervale constante în molecula proteinei corespunde unei „stări statice" a acesteia și nu stării dinamice active.

Forma moleculelor proteice nu este invariabilă în cursul desfășurării activității lor, ci ea se poate modifica în funcție de compoziția mediului; acesta va influența legăturile dintre diversele catene peptidice din molecula proteinei și deci îi va putea modifica structura ei macromoleculară. Acești autori leagă deci structura moleculei de condițiile în care aceste molecule trebue să intervină în acțiunile sale chimice, fizice și, în special, biologice.

ORGANIZAREA STEREOCHIMICĂ A MOLECULEI PROTEINICE

Am văzut că proteinele sunt formate din unități diferite de aminoacizi (200—50 000 de unități diferite). Aceste unități se combină între ele formând macromolecula proteinică, ce reprezintă o etapă superioară de organizare a materiei, în care molecula dobândește proprietăți chimice,

Scanned with OKEN Scanner

fizico-chimice, şi în special biologice cu totul noi (poate funcţiona ca un ferment, ca un hormon, ca un virus, ca un antigen, etc.). Organizarea catenelor peptidice în molecula proteinei poate explica unele din noile însuşiri câştigate, dar desigur, în stadiul actual al cunoştinţelor, nu încă pe toate.

Din punctul de vedere al orânduirii catenelor în macromolecula proteinei se pot distinge două tipuri de proteine, şi anume : proteide fibrilare sau fibroase şi proteide globulare sau sferide.

Proprietăţile fizice ale acestor două tipuri de proteide sunt diferite şi în raport cu acestea şi proprietăţile lor fiziologice.

1. **Proteinele fibrilare, liniare sau fibroase** — numite astfel din cauza structurii lor filiforme, în catene liniare — au în organism rol de susţinere şi de rezistenţă mecanică. Se regăseşte o structură de acest tip la keratina din firul de păr, de lână, la fibrina din mătase, la miozina din muşchi. In unele cazuri, ca de exemplu keratina din păr şi lână, axa lungă a lanţului peptidic este paralelă cu însăşi axa lungă a firului de păr sau lână şi în acest caz proprietăţile de rezistenţă, de elasticitate, ale acestor fire pot fi corelate cu însăşi structura catenei peptidice din componenta lor proteinică. Vom vedea la keratină şi alte amănunte asupra structurii acestei proteine, care explică proprietăţile ei.

2. **Proteinele globulare** sunt solubile, au formă ovală sau globulară, se găsesc în general în lichidele din organism, în interiorul celulelor, în soluţie. Catenele lor peptidice ar fi strânse în ghem, dar pot fi desfăşurate sub acţiunea diverselor substanţe, de exemplu NaOH, şi întregul ghem de peptide este desfăcut în catenele peptidice, în fibrilele din care este format. Dacă soluţia alcalină este lăsată să curgă printr'un capilar foarte fin, fibrilele sunt orientate paralel cu axa lungă şi totodată paralel cu direcţia de curgere. Dacă soluţia e lăsată să curgă printr'un orificiu foarte fin într'alt vas care conţine o soluţie coagulantă, de exemplu o soluţie acidă, fibrilele proteinice se unesc între ele paralel cu axa lungă, formând un fir vizibil macroscopic.

Din clasa proteinelor globulare sau solubile fac parte o mulţime de proteine cu funcţii fiziologice importante (enzime, hormoni).

Caracterizarea fizico-chimică a proteinelor fibrilare şi globulare

Deosebirile dintre proteinele globulare şi fibrilare sunt foarte mari şi sunt o consecinţă a însăşi structurii stereochimice a moleculei lor. Astfel :

1. *Viscozitatea soluţiilor de proteine globulare este mică, aceea a proteinelor fibrilare, mare.* Acest lucru este important, deoarece proteinele globulare care se găsesc în soluţie în lichidele din organism, având o viscozitate mică, au o posibilitate mai mare de a circula în aceste lichide decât substanţele cu viscozitate mare. Diferenţa de viscozitate a acestor două tipuri de proteine este în legătură cu însăşi structura lor globulară, respectiv filiformă.

2. *Proteinele fibrilare prezintă fenomenul dublei refracţii de curgere,* cele globulare nu prezintă acest fenomen. Când o soluţie de proteină fibrilară este obligată să curgă prin orificii foarte mici sau să circule prin spaţii foarte mici, se constată că prezintă fenomenul de dublă refracţie, întocmai ca anumite cristale ; acest lucru nu poate fi explicat decât prin

Scanned with OKEN Scanner

realizarea unei orientări anumite, pe anumite direcţii fixe, a moleculelor liniare din structura proteinelor fibrilare. O soluţie de proteine de acest tip, de exemplu de miozină, nu prezintă acest fenomen în repaus, deoarece moleculele sunt orânduite uniform în toată massa; obligate să curgă într'o direcţie anumită, moleculele, având o structură fibrilară, nu pot să se orienteze decât pe anumite direcţii fixe, paralele cu axa lor; soluţia devine astfel anisotropă ca un cristal şi prezintă fenomenul de dublă refracţie (fenomenul se poate realiza dacă punem soluţia în spaţiul dintre doi cilindri foarte apropiaţi, din care numai unul se roteşte în jurul celuilalt). Atât determinarea viscozităţii, cât şi a dublei refracţii de curgere sunt folosite pentru a pune în evidenţă structura liniară sau globulară a unei proteine oarecare.

Aplicarea metodei de cercetare cu raze X la studiul structurii proteinelor a confirmat existenţa acestor două tipuri de structură la proteine şi a dus la o cunoaştere mai exactă a structurii lor. Din spectrele de difracţie ale razelor X s'au dedus poziţia şi orientarea grupărilor atomice din moleculă, precum şi gradul de extensie sau de repliere a catenei peptidice. Vom vedea acest lucru când vom vorbi despre keratină.

Utilizarea microscopului electronic (permite o mărire de 30 000 ori) a adus anumite imagini care confirmă structura alungită (virusuri) sau globulară a proteinelor. Hemoglobina, ovalbumina, serumalbumina, serumglobulina, au formă sferică, virusurile ar avea formă alungită (500—1 700 Å).

Citâm după autorii sovietici (S. E. Bressler) următoarele asupra structurii proteinelor.

„Potrivit experienţelor, trebue să se admită că toate albuminele organismului se găsesc în stare de reînnoire permanentă, disociere şi sinteză cu toată stabilitatea aparentă a cantităţii lor". Intr'adevăr, trebue să admitem că acesti constituenţi tisulari nu au o structură imobilă, ei sunt sediul unor permanente degradări reversibile de sinteză.

Procesul chimic fundamental al descompunerii albuminei este disocierea legăturii peptidice — CO — NH — prin fixarea unei molecule de apă, adică prin hidroliză.

Sinteza lanţului peptidic, care reprezintă baza macromoleculei de proteină, constă în condensarea grupului aminic cu grupul carboxilic şi eliminarea de H_2O.

ORGANIZAREA MACROMOLECULEI PROTEINICE

In macromolecula albuminei intră 200—50 000 de diferite grupuri de diverse „unităţi" de aminoacizi, ceeace corespunde unei greutăţi moleculare de 12 000 până la $2-3 \times 10^{7}$. Cercetările noi au demonstrat că structura diferitelor „unităţi" elementare din care este constituită proteina (aminoacizi sau peptide simple) are un raport destul de îndepărtat cu molecula proteinei care participă la procesele vitale. Trecerea dela un aminoacid separat sau dela o combinaţie de doi-trei aminoacizi la molecule cu sute, mii, zeci de mii de diferite resturi de aminoacizi adunate laolaltă, determină prin variaţii cantitative saltul calitativ care duce la molecula proteinică. Aceasta reprezintă un nou mod de organizare a materiei, organizare macromoleculară în care moleculele au dobândit proprietăţi fizice şi chimice noi şi în special proprietăţi biologice noi. Astfel apar acum aci toate proprietăţile macromoleculei de proteină luată

Scanned with OKEN Scanner

ca un întreg, şi anume : forma ei, forţele de legătură ale macromoleculei şi reacţiile ei faţă de modificările mediului înconjurător.

Ajungând la acest nivel de organizare, macromolecula dobândeşte unele proprietăţi care nu sunt de ordin chimic sau fizic, ci se supun unor legi biologice noi. Ea poate să se comporte, de exemplu, ca un ferment sau ca un hormon ; poate dobândi proprietatea de a imuniza (proprietate antigenică). Toate aceste proprietăţi fine şi complicate sunt proprii numai macromoleculei proteinice considerată ca un nivel nou, mai ridicat, de organizare a materiei organice ; ele lipsesc cu desăvârşire la elementele din microstructura proteinei.

După acest al doilea nivel de organizare a materiei, după macrostructura moleculelor de proteină, şi ca o desvoltare a acestora apare celula, compusă dintr'o mulţime de proteine, precum şi din alte corpuri cu structură moleculară superioară.

Sinteza microstructurii este primul pas necesar pentru formarea particulei de proteină ; după aceasta urmează obligatoriu al doilea pas, sinteza macrostrücturii şi numai după aceasta se obţine proteina adevărată. Inelele micromoleculare, care puteau fi sintetizate cu ajutorul metodelor obişnuite întrebuinţate în chimia organică, nu posedă niciuna din proprietăţile biologice ale proteinelor naturale, iar pe de altă parte, proteine extrem de variate ca origină şi ca funcţie biologică se descompun uneori în cursul procesului de dislocare în inele elementare aproape identice.

Deaceea, desconsiderarea macrostructurii constitue o greşală, ca şi lipsa de atenţie faţă de microstructura acestei substanţe. Problema sintezei proteinelor apare ca o problemă de importanţă crucială.

Proteinele în soluţie apoasă sunt instabile din punct de vedere termodinamic. In orice celulă există enzime capabile de a cataliza scindarea proteinelor după moartea celulei, de a realiza aşa zisa autoliză celulară. Sunt enzimele proteolitice, de degradare. Or, desigur, rolul acestor enzime intracelulare nu este numai acela de degradare, ci şi de sinteză, menţinând un echilibru între aceste două procese, echilibru de tip dinamic. Se consideră astfel că reacţiile enzimatice sunt reversibile ; totuşi în condiţii de laborator în afară de celulă, procesele de sinteză fermentativă au rămas fără succes, deoarece cu niciun catalizator nu se poate modifica echilibrul impus de primul şi al doilea principiu al termodinamicei. Trebue precizat că pentru ca o reacţie chimică să aibă loc, condiţiile energetice necesare trebue să fie realizate. Numai adăugând energie acestor sisteme se poate deplasa echilibrul existent în sensul dorit. In organism, reacţiile care se petrec cu eliberarea de energie servesc ca sursă energetică pentru aceste reacţii de sinteză.

Se pune întrebarea : se poate realiza deplasarea echilibrului dela descompunere către sinteză în condiţiile de laborator, când proteina este extrasă din celulă şi este izolată de lanţul întreg al reacţiilor metabolice ? Autorii sovietici cred că acest lucru este posibil la presiuni extrem de mari. Când se formează macromoleculele din inele cu greutate moleculară mai mică, prin condensarea lor volumul scade cu ΔV. Dacă procesul se petrece la o anumită presiune φ, forţele exterioare exercită asupra sistemului travaliul p. ΔV şi deci energia liberă scade cu cantitatea $\Delta\varphi = p\,\Delta V$, deci presiunea va deplasa echilibrul dela descompunere către sinteză.

Scanned with OKEN Scanner

Consumul de energie liberă pentru crearea legăturilor peptidice în soluție apoasă reprezintă ~ 2 000 — 3 000 de calorii/moleculă. Acest consum poate fi compensat prin scăderea energiei libere sub acțiunea presiunii exterioare. De aici se poate deduce că presiunea P necesară pentru sinteză va fi de 5 000 — 10 000 atmosfere ($\Delta V = 14$ ml/mol).

Această cerință este realizată în experiențele autorilor sovietici. Substanțele inițiale folosite în aceste experiențe sunt diverse proteine disociate cu ajutorul fermenților proteolitici în polipeptide cu greutate moleculară redusă, conținând în medie 6—10 inele aminoacide (greutate moleculară 7 000—1 000). Astfel ei reușesc resinteza proteinei din produsele de hidroliză fermentativă. Hidrolizatul proteinic conținea (aproximativ 1%) un amestec de ferment și substanță tampon, care asigura pH-ul optim pentru acțiunea enzimei. Aceste soluții erau introduse în aparate unde se realizau presiuni mari (5 000—10 000 atm.). Produsul resintetizat (măsurat în grame) era studiat din toate punctele de vedere pentru a-i stabili numărul legăturilor peptidice, proprietățile fizice și în special cele biologice. Astfel se reușește resinteza gelatinei — dislocată cu tripsină. Procesul de dislocare și resinteză poate fi repetat de numeroase ori.

Determinarea azotului aminic (Van Slyke) arată numărul de grupări terminale — NH_2 eliberate în urma disocierii legăturilor peptidice — CO — — NH — din lanțul proteinic. Deci, cunoscând intensitatea de disociere, adică procentul legăturilor peptidice descompuse, putem ști volumul mijlociu al fragmentelor în care s'a descompus macromolecula. De exemplu, când intensitatea hidrolizei este de 15%, descompunerea atinge aproximativ 1/7 din legăturile peptidice; cu acest prilej, macromolecula albuminică formată din mii de inele de aminoacizi se descompune în fragmente conținând fiecare în medie un număr de 6 resturi de aminoacizi. După resinteză se reface aproape complect starea inițială a proteinei, adică azotul aminic scade până la volumul care exista înainte de disocierea proteinei. Dacă se calculează procentul legăturilor peptidice, se constată că în multe cazuri (albumina serică, ovalbumina) se ajunge la o resinteză care se apropie de 100%. Când se descompune legătura peptidică, împreună cu grupul aminic, se formează un grup carboxilic (COOH) liber; în cursul resintezei, acest grup trebue să dispară.

In hidrolizatul proteinic nu se constată nici proprietăți de haptenă și nici proprietăți antigenice, pe când după resinteză se recapătă o proteină cu aceeași activitate și aceeași specificitate antigenică ca proteina inițială. Proprietățile imunologice constitue unul din criteriile cele mai fine pentru punerea în evidență a variațiilor în microstructura proteinei. Se știe că proteinele serice ale diverselor animale au o specificitate antigenică diferită. Faptul că macromolecula resintetizată din fragmente mici absolut inactive manifestă proprietăți identice cu acelea ale proteinei naturale indică reușita resintezei.

Experiențele lui *Gliruchin* au arătat că resinteza miogenului duce la un compus cu proprietăți fermentative aproape identice cu acelea ale miogenului natural.

Deci, autorii reușesc să sintetizeze macrostructura moleculei de proteină din componentele rezultate din descompunerea enzimatică (proteolitică) a acesteia.

Posibilitatea resintezei prin aplicare de presiuni înalte e importantă și din alte puncte de vedere: 1) acela de a putea demonstra că în laborator

Scanned with OKEN Scanner

se pot sintetiza molecule mari, macromolecule; 2) se verifică justețea tezei că reacțiile enzimatice sunt reversibile și că deplasarea echilibrului este în funcție de prezența în sistem a unor donatori de energie. După Oparin, acest factor este legat de suprafața celulei. Experiențele lui A. J. Cursanov, Sisaschian, Rulin, în care se introduc în celule sub presiune, fermenți care sunt adsorbiți de suprafața interioară a celulei, demonstrează acest lucru. Importanța suprafeței interioare a celulei privită ca „factorul" care determină sensul proceselor fermentative de sinteză a fost pusă în evidență de acești autori.

PROPRIETĂȚILE FIZICE ȘI CHIMICE ALE PROTEINELOR

I. Proprietățile fizice

1. **Cristalizare.** Proteinele sunt în general amorfe, dar s'a reușit să se obțină unele din ele și sub formă cristalizată [hemoglobina, ovalbumina, (fig. 23), serumalbumina, lactalbumina, unele enzime (catalaza, pepsina, ureaza, etc.)]. Deși prin cristalizare se obțin în general molecule sub forma lor cea mai pură, s'a constatat că unele din aceste cristale conțin și mediu de disolvare și amestecuri de proteine.

2. **Solubilitate.** Sunt insolubile în alcool și eter și în genere în lichidele organice. In apă, unele sunt solubile, altele insolubile. Acestea din urmă sunt solubile în soluții saline diluate, în acizi slabi; în mediu alcalin, chiar pentru cele solubile există diverse grade de solubilitate. Solubilitatea este un criteriu de diferențiere a proteinelor. Gradul de solubilitate este în funcție de prezența în moleculă a grupărilor hidrofile care au afinitate pentru apă, cum sunt grupările polare — COOH; —OH; —NH, capabile de a fixa apa prin legături de hidrogen; datorită acestor grupări, moleculele proteinice se hidratează, și acestui fapt îi este datorit în parte caracterul coloidal al soluțiilor proteinice. Acestea sunt coloide hidrofile. Se admite că moleculele apei, care sunt dipoli puternici, se unesc cu grupările polare ale macromoleculei proteinice prin forțe electrostatice.

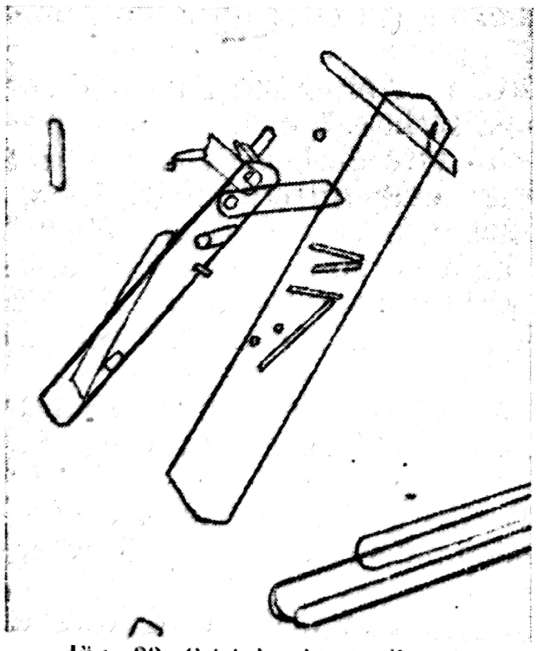


Fig. 23. Cristale de ovalbumină

3. **Activitate optică.** In soluții, proteinele sunt optic active: cele naturale sunt în general levogire — conțin numai aminoacizi aparținând seriei *l* (+) sau (—). Puterea rotatorie variază pentru diversele proteine. Unele proteine conjugate (hemoglobina, nucleoproteinele) sunt însă dextrogire, deși componenta lor proteinică e levogiră (componenta prostetică e astfel mai puternic dextrogiră).

4. **Caracterul coloidal al soluțiilor de proteină.** Proteinele în soluție sunt în stare coloidală, formează soluții de tipul coloizilor hidrofili. Caracterul coloidal al soluțiilor proteinice este datorit în special mărimii moleculei

Scanned with OKEN Scanner

proteinice. Pentru unele proteine, macromolecula este însăşi particula coloizilor, pentru altele, de exemplu gelatina, cazeina, e probabil că se formează agregate moleculare alături de molecule izolate, aşa cum s'a dedus din experienţe de ultracentrifugare.

Proteinele vor avea astfel toate proprietăţile caracteristice stării coloidale, şi vor avea deci în soluţie : *putere de difuziune mică, presiune osmotică mică,* precum şi *toate proprietăţile optice* (prezintă fenomenul Tyndall) şi *electrice ale soluţiilor coloidale* (*supuse unui câmp electric, prezintă fenomenul de electroforeză, adică de migrare spre unul sau altul din polii electrici*).

5. **Caracterul amfoter al proteinelor** este datorit prezenţei grupărilor bazice şi acide ($-NH_2$ şi $-COOH$) conţinute în aminoacizii din moleculă. O proteină oarecare va putea astfel funcţiona, fie ca acid, fie ca bază, în funcţie de pH-ul mediului în care se găseşte. Prin acest caracter amfoter, proteinele au un rol fundamental în menţinerea echilibrului acido-bazic din organism, au deci rol tampon extrem de important. Funcţia de tampon a proteinelor se exercită într'o zonă mult mai largă de variaţii posibile ale mediului, deoarece în molecula lor există o serie întreagă de aminoacizi având pH-uri diferite şi care astfel pot interveni în domenii diferite de pH.

6. **Proprietăţile electrice ale proteinelor.** Proteinele în soluţie supuse unui curent electric continuu vor migra spre polul (+) sau (—), ceeace indică faptul că particula coloidală proteinică are o încărcare electrică (—) sau (+), de semn contrar cu aceea a electrodului spre care este atrasă. Acest fenomen de migrare a particulelor coloidale într'un câmp electric este cunoscut sub numele de *electroforeză* şi se realizează experimental dacă se introduce soluţia proteinei într'un tub în formă de U, la capetele căruia sunt introduşi doi electrozi legaţi fiecare cu polul + sau — al unei baterii elcctrice. Semnul şi mărimea încărcării electrice a particulei proteinice din soluţie sunt în funcţie de pH-ul soluţiei. Pentru fiecare proteină există un pH la care particula proteinică este electric neutră, deci un pH la care migrarea spre polii câmpului electric nu se produce.

Acest pH poartă numele de pH izoelectric (pHi) şi este o caracteristică a fiecărei proteine. Sub pH-ul izoelectric, proteina migrează la unul din poli, deasupra acestui pH la polul de semn contrar. Poziţia pHi este caracteristică fiecărei proteine şi este condiţionată de raportul dintre grupările $-COOH$ şi $-NH_2$ din molecula proteinei. Proteinele cu mai multe grupări acide vor avea un pHi în zone mai acide, cele cu mai multe grupări NH_2 în zone mai alcaline. In soluţii, deci, după pH-ul mediului, o proteină va putea funcţiona fie ca acid, fie ca bază, în raport cu pHi, şi anume, în soluţii acide sub pH-ul izoelectric, proteina există ca ion încărcat pozitiv şi se va comporta ca o bază, unindu-se cu ionii negativi pentru a forma săruri ; în soluţii cu pH-ul mai alcalin decât pHi va funcţiona ca un ion încărcat negativ, se va comporta ca un acid unindu-se cu ionii pozitivi pentru a forma deasemenea săruri.

Această comportare conferă proteinei proprietăţile de a funcţiona ca tampon în menţinerea echilibrului acido-bazic din organism. Poziţia punctului izoelectric al proteinelor este importantă pentru întreaga comportare a proteinelor, deoarece proprietăţile lor fizico-chimice sunt profund modificate. Solubilitatea lor e minimă la pHi, deasemenea viscozitatea, presiunea osmotică, capacitatea lor de inbibiţie. Proprietăţile acestea sunt dependente de un echilibru Donnan care are loc între par-

Scanned with OKEN Scanner

ticula proteinică şi mediul înconjurător. Dăm un tabel al pHi al unor proteine importante (tabelul 3). Poziţia pHi al unei proteine determină întreaga comportare a acesteia într'un mediu dat şi îi determină toate caracterele sale fizico-chimice, chimice şi fiziologice în acel mediu. pH izoelectric se determină fie prin electroforeză, fie prin pH-ul corespunzător minimului de solubilitate.

Tabelul 3

pHi al diverselor proteine

Serumalbumina	4,88
Serumglobulina	5—7
Hemoglobina (cal)	6,7 — 6,8
Miozina	5,4
Pepsina	1 (după alţii 2,8) ?
Insulina (pancreas de porc)	5,30 — 5,35
Cazeina	4,6

7. Acţiunea sărurilor asupra soluţiilor de proteine. Sărurile pot modifica solubilitatea proteinelor în apă, fie insolubilizând pe cele solubile, fie solubilizând pe cele insolubile. Multe proteine insolubile în apă pură devin solubile în soluţii diluate de săruri (ClNa); dimpotrivă unele, solubile în apă pură, sunt insolubilizate în soluţii saline concentrate. Această acţiune de insolubilizare a unor săruri s'ar explica printr'o afinitate mai mare pentru apă a acestora, care deci atrag moleculele apei mai mult decât grupările polare ale moleculei proteinice şi prin aceasta o insolubilizează.

Capacitatea proteinelor solubile de a rămânea în soluţie este datorită pe de o parte încărcării electrice a particulelor (particulele sunt de acelaş semn şi resping); pe de altă parte, capacităţii de hidratare, afinităţii pentru moleculele apei datorită grupărilor lor polare. Acţiunea de insolubilizare a sărurilor este reversibilă, şi anume, prin diluarea soluţiei precipitatul se redisolvă, deci aceste săruri nu modifică natura internă a structurii moleculare, ci numai legătura cu moleculele apei. Concentrarea salină necesară precipitării diverselor proteine este caracteristică fiecărei proteine, astfel că, variind această concentrare, se pot precipita fracţionat dintr'un amestec de proteine diversele fracţiuni. Vom vedea că aceasta este chiar o metodă frecventă de dozare şi separare a proteinelor din lichidele biologice (plasmă, lichid cefalorahidian etc.). Dependenţa solubilităţii proteinelor de conţinutul salin al soluţiei este în legătură cu caracterul amfoter al moleculei proteinice.

II. Proprietăţile chimice ale proteinelor

Proteinele pot fi scindate în componentele lor sub acţiunea hidrolitică a acizilor, alcalilor, enzimelor.

1. Hidroliza acidă poate duce la scindarea proteinelor până la aminoacizi; reacţia e lentă la temperaturi mici şi chiar la 100°, e accelerată la temperaturi şi presiuni mari şi sub acţiunea acizilor concentraţi. Hidroliza acidă distruge triptofanul din molecula proteinică.

2. Hidroliza bazică duce deasemenea până la degradare în aminoacizii componenţi. Hidroliza alcalină distruge cistina şi cisteina.

3. Hidroliza enzimatică a proteinelor se face sub acţiunea grupei de enzime proteolitice. In această grupă (vom vedea la capitolul enzimelor) sunt cuprinse o serie de enzime, din care fiecare are altă cale de degradare a proteinelor, acţiunea lor fiind specifică. Astfel, proteazele, în grupa cărora intră pepsina, tripsina, catepsina, fac degradarea proteinelor native.

Scanned with OKEN Scanner

Peptidazele încep acțiunea de degradare abia când proteina e degradată la peptid, fiecare din ele având la rândul ei acțiuni strict specifice în ceeace privește legătura din lanțul peptidic, unde pot cataliza scindarea.

4. **Denaturarea proteinelor.** Proteinele au o structură extrem de labilă; acest lucru explică marea variabilitate a funcțiilor pe care le îndeplinesc în celula vie. Izolarea proteinelor din celula vie duce desigur la o modificare a proprietăților lor; această modificare poate fi însă mai profundă sau mai superficială. O proteină izolată din țesuturile vii este o proteină așa zisă nativă dacă păstrează compoziția în aminoacizi și proprietățile structurale cât mai apropiate de acelea ale stării sale naturale.

Sub acțiunea diverșilor agenți chimici și fizici, însă, proteinele native pot fi modificate din punctul de vedere al structurii și compoziției lor. Acești agenți se numesc agenți denaturanți, iar procesul de modificare se numește denaturare. Ușurința cu care o proteină este denaturată variază cu diversele proteine. Unele sunt ușor denaturate, în special proteinele care în soluție sunt fibroase sau mult alungite, ca de exemplu miozina musculară; altele sunt rezistente, de exemplu glicoproteidele.

Agenții denaturanți pot fi 1) *agenți chimici*, ca de exemplu sărurile metalelor grele, acizii și bazele tari, alcoolul, ureea; 2) *agenți fizici*, căldura, ultrasunetele, razele ultraviolete, razele X, presiunile mari; 3) *factori mecanici* (agitare).

Denaturarea constă într'o modificare a proprietăților chimice și structurale ale proteinei naturale, dar este rareori complectă într'o singură etapă și, dacă aceste modificări nu sunt prea profunde, proprietățile naturale pot fi refăcute. In acest caz are loc o denaturare reversibilă. In cazurile în care denaturarea este prea profundă, proprietățile naturale nu mai revin, avem de a face cu o denaturare ireversibilă. Denaturarea se manifestă printr'o modificare a viscozității, presiunii osmotice, solubilității proteinelor, cele cristalizabile nu mai pot cristaliza, enzimele de structură proteinică sunt inactivate. Proteinele naturale, în mod normal solubile, devin insolubile și floculează în soluție. Unul din agenții denaturanți cei mai caracteristici pentru proteine este căldura. Denaturarea termică duce la o insolubilizare a proteinelor în soluție, la coagularea lor.

Flocularea și coagularea apar astfel ca manifestări vizibile ale modificărilor care au loc în moleculă prin denaturarea acestora, ambele fenomene fiind consecințe ale insolubilizării. Denaturarea duce probabil la o modificare a capacității moleculei de a fixa apa, realizând schimbări mai profunde, care nu pot fi încă pe deplin lămurite. S'a constat astfel pentru unele proteine că, prin denaturare, se eliberează valențe noi, de exemplu: grupări disulfidinice — S — S —, grupări tiolice -SH. Procesul s'ar explica în felul următor: grupările -SH în proteina nativă, datorită caracterului globular al moleculei, sunt închise în ciclu, deci mascate față de reactivii specifici acestei grupări. Denaturarea are drept consecință deschiderea ciclului, molecula este alungită, capătă caracter fibros și grupările -SH sunt eliberate și făcute accesibile reactivilor care le pot pune în evidență. Acest tip de denaturare a proteinelor are caracter ireversibil și are loc într'o serie de procese fiziologice, ca: fecundarea ouălor de ursin, contracția musculară, percepția luminii în retină și, după unii autori, în timpul mitozei. Acest tip de denaturare ar preceda diviziunea și ar modifica întregul metabolism, știut fiind rolul grupării -SH asupra activității diverselor enzime.

Scanned with OKEN Scanner

Temperatura de coagulare variază pentru diversele proteine între 56—100°. Proteinele în stare uscată nu sunt denaturate prin căldură. In adevăr, o proteină sub formă uscată, încălzită la 100° şi ulterior disolvată, se comportă normal, adică se disolvă; încălzită după o prealabilă disolvare, precipită. Sub acţiunea razelor ultraviolete s'au constatat modificări profunde, care duc uneori la scindare de amoniac.

Prin denaturare, proteinele trec din starea labilă într'o stare stabilă, ce nu mai corespunde capacităţii lor de a avea funcţii biologice atât de multiple, care sunt explicate tocmai prin labilitatea lor, prin capacitatea lor de a se modifica continuu.

Proprietăţile biochimice ale proteinelor

Proprietăţile biochimice ale proteinelor sunt de importanţă fundamentală. Proteinele există în absolut toate celulele. Organismul sintetizează proteinele proprii fiecărei celule din aminoacizii rezultaţi din degradarea proteinelor alimentare. Fiecare organ al aceluiaş animal conţine proteine specifice, diferite de ale altui organ. Proteinele sunt astfel *organospecifice*. In acelaş timp, acelaş organ conţine proteine specifice, care variază dela specie la specie, deci proteinele sunt şi *specii specifice*. Această enormă diversitate a proteinelor care, în unitatea lor cea mai complexă, conţin totuşi aceiaşi aminoacizi, se explică prin infinitele posibilităţi de orânduire ale acestora în molecula unei proteine şi prin capacitatea de adaptare a acestor molecule mari la condiţiile mediului în care se găsesc.

Metodele chimice şi fizico-chimice curente nu pot diferenţia cu atâta finețe diversele proteine între ele — tehnicile fiind în faza actuală insuficient de sensibile. Există însă metode biologice capabile de a pune în evidenţă cele mai subtile diferenţe din structura proteinelor, prin utilizarea proprietăţilor imunologice ale proteinelor. De exemplu: inoculând unui animal o proteină străină de organismul său, după o serie de inoculări serul acestui animal capătă proprietatea de a precipita în mod specific numai proteina care a fost folosită la inoculare. Proteinele inoculate la un animal stimulează la acesta formarea anumitor substanţe capabile de a reacţiona în mod specific cu proteina inoculată. Substanţa inoculată se numeşte *antigen*, substanţa care apare în urma inoculării şi e capabilă să reacţioneze cu antigenul se numeşte *anticorp*, iar serul care a căpătat aceste proprietăţi noi se numeşte *ser imun*. Reacţia dintre antigen şi anticorp este strict specifică şi poate servi astfel la identificarea şi diferenţierea proteinei care a fost folosită la inoculare.

Pentru ca o substanţă anumită să poată funcţiona ca un antigen, trebue să fie o proteină sau să fie conjugată cu o proteină sau, în general, o substanţă macromoleculară (polizaharidică, de structură coloidală), să aibă o structură coloidală şi să fie o substanţă străină de sângele animalului inoculat.

Anticorpii sunt probabil tot proteinele din ser, dar modificate structural şi probabil chimic, datorită prezenţei antigenului în organele în care are loc formarea proteinelor. Apariţia anticorpilor în sângele animalului este pusă în evidenţă prin reacţiile care au loc între acest anticorp şi antigenul care a servit la inoculare; de exemplu, dacă antigenul este o proteină solubilă, ea este precipitată de către serul animalului inoculat;

Scanned with OKEN Scanner

dacă este o suspensie de globule roşii, acestea sunt hemolizate; dacă este o bacterie, este aglutinată. Reacţia este strict specifică şi de o mare sensibilitate. Astfel, se poate pune în evidenţă o proteină care a servit la inoculare, în concentraţii de numai 1/10 000 000, 1/20 000 000 sau chiar la 1/100 000 000. Reacţia este în acelaş timp extrem de specifică; serul animalului inoculat cu albumină de ou dă precipitare uneori cu această albumină, dar nu dă cu albumina din lapte sau din ser. Deci, cu ajutorul acestei metode se pot pune în evidenţă diferenţe sau înrudiri individuale ale proteinelor, diferenţe sau înrudiri care chimic nu pot fi percepute. Astfel, s'a dovedit cu această metodă că proteina din cristalinul ochiului e aceeaşi la diversele animale. Metoda este utilizată în medicina legală pentru diferenţierea specifică a urmelor de sânge uman de sângele altor animale.

Reacţiile de recunoaştere ale proteinelor

Se împart în: reacţii de culoare şi reacţii de precipitare.

A. Reacţiile de culoare

Sunt datorite diverselor grupări din molecula proteinei.

1. **Reacţia biuretului** e dată de toate proteinele şi e datorită legăturii polipeptidice. Culoarea cu SO_4Cu diluat în soluţie alcalină este albastră-roşie (violet) cu proteinele, roz cu peptonele şi slab-roz cu peptidele.

2. **Reacţia Millon,** coloraţie roşie cu o soluţie de azotat mercuros în acid azotic este datorită grupărilor fenolice ($- C_6H_4 - OH$) (de exemplu tirozina), din molecula proteinei.

3. **Reacţia xantoproteică,** coloraţie galbenă cu acidul azotic la cald, e dată de ciclul benzenic $- C_6H_5$, deci de aminoacizii ciclici, triptofan, tirozină, fenilalanină, din molecula proteinei.

4. **Reacţia Adamkiewicz—Hopkins,** inel violet cu o soluţie de acid glioxilic $CHO - COOH + H_2O$, la suprafaţa de contact dintre cele două soluţii, e datorită deasemenea triptofanului din moleculă.

B. Reacţiile de precipitare

Proteinele precipită în condiţii variate şi anume:

1. **sub acţiunea unor acizi, aşa numiţi „reactivi alcaloidici"** (acid picric, tungstic, tanic, acid tricloracetic);
2. **sub acţiunea metalelor grele Hg, Pb;**
3. **sub acţiunea agenţilor denaturanţi,** alcool, acetonă, etc.;
4. **sub acţiunea sărurilor neutre:** SO_4Na_2; $SO_4(NH_4)_2$, SO_4Mg.

Concentraţia de precipitare a acestor săruri variază pentru fiecare tip de proteină şi e utilizată chiar în analiza fracţionată a proteinelor din ser. După precipitare, sărurile se îndepărtează din soluţie prin dializă. Precipitarea prin săruri a proteinelor este deci reversibilă, deoarece, prin îndepărtarea agentului precipitant, proteina reintră în soluţie.

Precipitarea proteinelor prin săruri se face cantitativ la pH-ul lor izoelectric; prin precipitare la acest pH, unele proteine se pot obţine sub formă cristalizată.

Scanned with OKEN Scanner

CLASIFICAREA PROTEINELOR

Proteinele se împart în următoarele grupe :

I protamine,
II histone,
III gliadine sau prolamine,
IV gluteline,
V albumine,
VI globuline,
VII scleroproteine.

I. Protaminele

Protaminele sunt proteine cu moleculă mică, cu greutate moleculară între 2 000—4 000. Au caracter puternic bazic datorită conținutului lor mare în baze hexonice (diaminoacizi); conțin ~ 95% arginină. Se găsesc în special în nucleul celulelor spermale ale peștilor. Multe din ele au fost chiar izolate din sperma peștilor, unde se găsesc combinate cu acizii nucleici, numele acestor complexe corespunzând speciei dela care au fost izolate ; de exemplu, salmina din somn (*Salmo Salar*), ciprina, sturmina, etc.

Protaminele nu coagulează prin căldură, nu conțin sulf, nu sunt hidrolizate de către pepsină, ci de alte enzime cu acțiune specifică. Hidroliza enzimatică a dat indicații prețioase asupra structurii lor. Am spus că aceste proteine conțin în special acizi diaminocarboxilici, a căror succesiune în moleculă se produce cu o anumită regularitate. Conținutul în aminoacizi variază cu proveniența acestor proteine.

II. Histonele

Au o structură ceva mai complicată decât protaminele. Au și ele caracter bazic, dar mai slab. Conțin mari cantități de acizi monobazici în molecula lor, în special histidină și lizină. Se găsec în special în nucleii celulari, în sperma peștilor, în nucleii celulelor din timus, în nucleul globulelor roșii nucleate (ale păsărilor), intrând în structura nucleoproteidelor.

Din grupa histonelor fac parte globina, constituentul proteinic al hemoglobinei. Globinele conțin triptofan, tirozină, arginină, histidină și lizină, în raportul 2 :3 :3,8 :3. Sunt coagulabile prin căldură și sunt hidrolizate de pepsină.

III. Prolaminele sau gliadinele

Au un conținut mare în prolină. Sunt proteine vegetale, insolubile în apă și alcool, ușor solubile în alcali. Conțin acid glutamic în cantitate mare, nu conțin histidină, lizină, arginină, deci au o valoare biologică scăzută. Interesante sunt zeina din porumb, gliadina din grâu, hordeina din orz.

IV. Glutelinele

Glutelinele sunt proteinele din bobul cerealelor, resturi de gliadine. Impreună cu acestea formează glutenul. Glutelinele conțin lizină și complectează astfel gliadinele ca valoare biologică.

Scanned with OKEN Scanner

V. Albuminele

Sunt proteine tipice. Alături de globuline sunt cele mai importante proteine animale. Au greutate moleculară mare, sunt solubile în apă pură, în acizi şi alcali slabi, într'o soluţie saturată de NaCl şi sulfat de magneziu, precipită însă în soluţii saturate de sulfat de amoniu, ceeace le diferenţiază de globuline. Coagulează prin căldură la 70—73°. Prin hidroliză eliberează aproape toţi aminoacizii afară de glicocol. Există mai multe albumine, denumite după locul lor de origină: albumina din ou, ovalbumina, serumalbumina sau serina din serul sanguin, mioalbumina din muşchi, lactalbumina din lapte, legumelina din bobul de mazăre. Unele albumine din plante sunt toxice; de exemplu, albumina din ricin, injectată la iepure în doze de 0,003—0,005 mg pe kilocorp, e mortală. Prin digerare toxicitatea dispare. In serul sanguin, albuminele sunt în proporţie de 4—5,5 g%.

Fracţiunea cunoscută sub numele de albumină serică nu este de fapt o componentă cu structură unitară; prin variaţii de pH şi fracţionare cu $SO_4(NH_4)_2$, precum şi prin electroforeză, s'a reuşit separarea a trei fracţiuni albuminice bine definite. Una din fracţiuni e uşor cristalizabilă. Au structură globulară. Datorită afinităţii lor mari pentru apă, au un rol important în determinarea valorii presiunii coloid-osmotice a sângelui, deci în reglarea apei şi sărurilor în organism, în reglarea schimbului de apă între plasmă şi ţesuturi. Scăderea cantităţii de albumină micşorează stabilitatea plasmei sanguine. Se crede că albuminele se formează în ficat.

Miogenul este albumina din muşchi, unde se găseşte sub forma solubilă şi e probabil proteina din sarcoplasmă.

VI. Globulinele

Globulinele eliberează prin hidroliză glicocol, pe când albuminele nu conţin acest aminoacid sau îl conţin sub formă de urme.

Din grupa globulinelor fac parte: fibrinogenul, serumglobulinele, ovoglobulina, lactoglobulina, tireoglobulina (din glanda tiroidă), miozina musculară, vicilina din mazăre, edestina din vegetale şi proteina din cristalin.

Globulinele, alături de albumine, sunt proteinele caracteristice ale plasmei sanguine şi, în general, apar împreună în protoplasmă. Au o serie de proprietăţi comune, sunt coagulabile prin căldură, dar diferă între ele prin solubilitatea lor.

1. Albuminele sunt solubile în apă, pe când globulinele sunt insolubile.
2. Globulinele sunt mai uşor solubilizate prin săruri decât albuminele; astfel, globulinele precipită cu soluţii saturate de clorură de sodiu, de sulfat de magneziu şi în soluţii semisaturate de sulfat de amoniu. Această din urmă proprietate este utilizată pentru separarea şi dozarea acestor două fracţiuni proteinice dintr'un amestec, de exemplu, din serul sanguin.

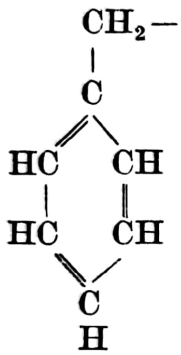
Albuminele apar astfel mult mai stabile în soluţie, fapt interpretat ca fiind datorit prezenţei la suprafaţa moleculei lor a grupărilor ionice de acelaş semn electric (+), care, prin respingerea lor electrostatică, împiedică aglomerarea particulelor, menţinându-le uniform dispersate în soluţie. Globulinele ar avea la suprafaţa moleculelor lor şi grupări NH_3^+ şi grupări COO^-, care prin atracţia pe care o exercită între ele tind să aglomereze particulele, să le precipite.

Scanned with OKEN Scanner

Nu amintim aici despre proteinele din ser, despre diversele fracțiuni globulinice din ser și rolul fiecăreia din ele; acestea vor fi lămurite la capitolul despre biochimia sângelui. Deasemenea, nu insistăm asupra miozinei din mușchi, aceasta urmând a fi descrisă la capitolul care se ocupă cu biochimia țesutului muscular.

VII. Scleroproteinele

Scleroproteinele sunt proteinele scheletului. Se găsesc în organism în stare solidă și au rol de susținere și rezistență mecanică, precum și de protecție. Sunt insolubile în apă rece, chiar în prezența sărurilor, acizilor, bazelor diluate. Se deosebesc mult de celelalte proteine. Sunt mai bogate în oxigen și mai sărace în azot. Conțin puține componente bazice. Se mai numesc și proteinoide, deoarece conțin aminoacizi ca atare și aminoacizi desaminați, de exemplu acidul fenilpropionic. Sunt în genere rezistente față de acțiunea enzimelor. Scleroproteinele se împart în două grupe mari: colagenele și keratinele.



Acid fenilpropionic

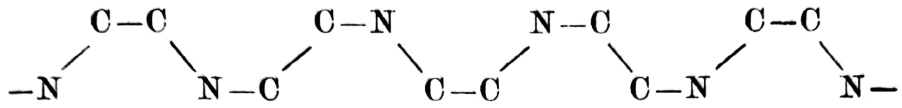
Colagenele, prin fierbere cu apă, formează gelatina. Gelatinele diferă de proteine prin aceea că nu conțin triptofan, tirozină și cistină. Colagenele se găsesc în țesuturile conjunctive, tendoane, cartilaje, oase (de exemplu, oseina e un colagen). Intră ca componentă principală în structura pielei, oaselor, tendoanelor. Nu sunt digerate de pepsină sau tripsină decât după transformarea lor în gelatină. Colagenul devine foarte rezistent sub acțiunea acidului tanic (procesul de tăbăcire).

Elastina este proteina care intră în structura fibrelor elastice din țesutul conjunctiv, tendoane, artere. Sunt compuși insolubili.

Keratinele sunt proteinele din epiderm, păr, unghii, pene, coarne, lână. Se deosebesc de toate celelalte proteine prin conținutul lor mare în sulf, care provine din cistină (7,3% cistină). Sunt foarte greu solubile. Nu sunt hidrolizate de proteaze, deaceea nu au valoare alimentară. Aparțin grupei proteinelor fibrilare. Structura lor macromoleculară este bine cunoscută datorită studiului cu ajutorul razelor X. Proteinele cu structură fibrilară (keratina, fibrina din mătase, miozina din mușchi) au o formă alungită, o moleculă formată din catene peptidice paralele legate între ele prin legături de diverse tipuri: legături ionice între grupele COO^- și NH_2^+ și în special legături disulfidice — S — S — la compușii care conțin sulf (legături rezultate din dehidrogenarea a câte două grupe — SH), legături de H și O, forțe de tip Van der Waals (forțe de atracție electrică între atomii moleculelor vecine). Catenele polipeptidice pot fi mai extinse sau mai repliate, după cum distanțele dintre aceste catene sunt mai mici sau mai mari, lucru constatat cu ajutorul spectrelor de difracție cu raze X. Din röntgenogramele obținute s'au putut trage concluzii asupra gradului de extensie a catenelor polipeptidice. Acest studiu a fost făcut în detaliu la keratina din păr de către Astbury. Keratina normală, cunoscută sub numele de α-keratină, așa cum rezultă din spectrul său de difracție cu raze X, este formată dintr'o serie de catene

Scanned with OKEN Scanner

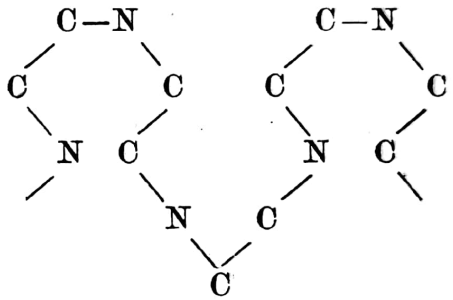
orânduite paralel şi unite între ele prin legături de hidrogen H.....O şi mai ales prin legături S — S din molecula cisteinei, distanța dintre planul catenelor fiind de 10 Å (1 Å = 10^{-8} cm); catenele polipeptidice prezintă o anumită sinuozitate. Dacă supunem α-keratina acțiunii vaporilor de apă, se realizează o alungire a acestei catene cu 100%. Keratina astfel modificată se notează cu β; distanța dintre catenele ei este de 3,4 Å :



β-keratina

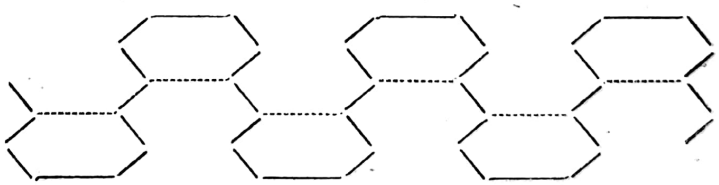
β-keratina poate trece din nou în keratina, deci există posibilitatea de trecere dela o anumită extensie a moleculei la altă stare de extensie. Deformarea e deci reversibilă şi, datorită acestui fapt, keratina are proprietăți elastice. Capacitatea de extensie şi de repliere a mănunchiului de catene peptidice din molecula keratinei, a cărei axă lungă e paralelă cu axa firului de păr, explică elasticitatea acestuia :

α-keratina extinsă cu 50% din lungimea inițială (nu cu 100%) şi apoi supusă acțiunii vaporilor de apă timp de 1/2 oră nu mai poate reveni la lungimea inițială; dimpotrivă, se scurtează, sinuozitățile sunt mai strânse şi acestei stări îi corespunde alt spectru de difracție, spectrul aşa numitei stări de „supracontracție" a moleculei de keratină (Acest fenomen este la baza coafurilor aşa zise permanente).



α - keratina

In rezumat, proprietățile elastice ale keratinei sunt deci în legătură cu starea de extensie, sau de repliere a moleculelor din catena liniară a keratinei, aşa cum rezultă din studiul cu raze X, din röntgenogramele moleculelor de keratină. Rezistența mare la tensiuni a firului de păr se explică prin numărul mare de catene peptidice similare aşezate paralel în molecula proteinei. Rezistența ei la acțiunea enzimelor se explică prin înmănuncherea strânsă a catenelor polipeptidice paralele, prin legături disulfidice stabilite între grupările cisteinei din molecula lanțului peptidic.



forma supracontractată

Capacitatea de extensie sau de repliere a catenelor peptidice din molecula proteinelor fibrilare se regăseşte şi la importanta proteină din muşchi, la miozină, proprietate care a fost pusă în legătură cu procesul contracției musculare (lucru pe care îl vom vedea mai în detaliu la capitolul asupra chimismului țesuturilor musculare).

Fibroina din mătase e înrudită cu keratina, se găseşte alături de sericină în firul de mătase produs de larvele de *Bombyx mori*; fibroina constitue fibra propriu zisă, iar sericina materia cleioasă care o înconjoară şi aparține grupei colagenelor.

Scanned with OKEN Scanner

Cenapsele

Cenapsele sunt complexe constituite din proteine şi alte componente neproteice, complexe sub care se găsesc în general proteidele în celula vie. Există astfel cenapse proteo-lipidice, proteo-glucidice, etc. Legătura dintre aceste componente poate fi mai mult sau mai puţin stabilă. Este probabil că modul de comportare al unei proteide în celula vie depinde şi de componenta neproteică din structura cenapsei. Cenapse în care legătura dintre componenta proteică şi neproteică este foarte stabilă sunt şi heteroproteidele.

B. HETEROPROTEIDELE

Heteroproteidele, sau simplu proteidele, sunt complecşi formaţi dintr'o componentă proteică şi una neproteică, numită şi grupare prostetică. Clasificarea heteroproteidelor se face după natura acestei grupări.

I. Fosfoproteidele

Fosfoproteidele conţin ca grupare prostetică acidul o-fosforic (PO_4H_3) în concentraţia de aproximativ 0,7%, deaceea aceşti compuşi au o reacţie puternic acidă. Sub acţiunea alcalilor diluaţi, radicalul fosforic este eliminat cu uşurinţă din moleculă; fosfoproteidele apar astfel ca esteri ai acidului o-fosforic.

In general, acidul o-fosforic esterifică gruparea alcoolică primară din oxiaminoacidul serina, din molecula proteinei. Acest lucru a fost pus în evidenţă la cazeină, unde prin hidroliză triptică are loc eliberarea unui ester semifosforic.

Este probabil că şi alţi oxiaminoacizi (treonina) din moleculă pot fi esterificaţi de acidul o-fosforic. Fosfoproteidele servesc probabil pentru hrana animalelor tinere, deoarece se găsesc cu preponderenţă în lapte, ouă.

$CH_2-O-PO_3H_2$
|
$HC-NH_2$
|
$COOH$

esterul fosforic al serinei

Cazeina din lapte este cea mai importantă fosfoproteidă. Se găseşte sub formă de sare de calciu solubilă în laptele de vacă şi unită cu K în laptele de femeie. Soluţiile pure de cazeină sunt opalescente (lactescente). Cazeinele diverselor mamifere variază între ele prin proporţia diverşilor aminoacizi din moleculă. Conţin aproape toţi aminoacizii importanţi, sunt deci un aliment complect. Cazeinele precipită sub acţiunea acizilor, nu coagulează prin căldură, apără chiar şi pe celelalte proteine din lapte (albumine, globuline) de coagulare în aceste condiţii. Sub acţiunea unei enzime specifice, chimozina, care se găseşte în stomacul animalelor tinere, cazeina este transformată ireversibil într'o substanţă insolubilă, paracazeina. Precipitatul acesta conţine şi calciu.

Nu se ştie cu precizie mecanismul acestei transformări. Este probabil că are loc o rupere a moleculei de cazeină cu eliberarea unei proteine, care are de obicei rol protector de menţinere a cazeinei în soluţie. In stomacul animalelor mari, inclusiv al omului, această transformare se poate face cu ajutorul altor enzime proteolitice (pepsina, de exemplu).

Scanned with OKEN Scanner

Vitelina sau ovovitelina este fosfoproteida din gălbenușul de ou, unde probabil este legată de lecitină, de care nu se poate separa decât prin denaturare. Conține fier în moleculă.

II. Glicoproteidele

Glicoproteidele conțin ca grupare prostetică derivați acizi ai glucidelor, legați probabil cu grupările bazice din molecula proteinei.

Se găsesc în umoarea vitroasă, în cordonul ombilical, etc.

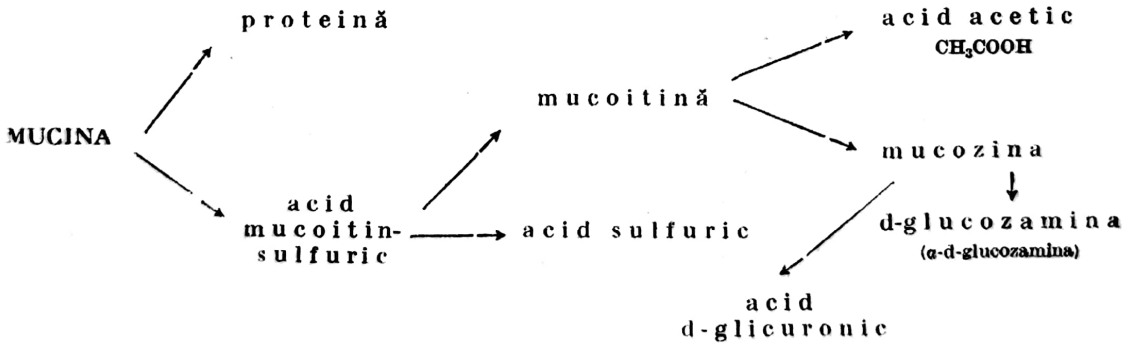
Se împart în două grupe mari : mucinele sau mucoidele și condroidele.

Mucinele au ca grupare prostetică acidul mucoitinsulfuric, iar condroidele, acidul condroitinsulfuric.

1. **Mucinele**. Aceste substanțe se găsesc în produsul de secreție al unui mare număr de glande și al mucoaselor. Sunt semilichide, au viscozitate mare, apără mucoasele împotriva acțiunilor chimice și mecanice și împiedică pătrunderea microorganismelor. Intervin în fenomenul de fixare a apei, menținând astfel umiditatea mucoaselor. Mucina din salivă favorizează alunecarea alimentelor.

Mucinele precipită cu alcool și acid acetic ; sunt insolubile în alcali diluați. Nu coagulează prin căldură, ceeace le diferențiază de proteine ; această proprietate servește la identificarea lor în urină.

Reduc soluția Fehling după hidroliză, datorită zahărului eliberat ; nu sunt atacate de pepsina gastrică și li se atribue rolul de a apăra mucoasa gastrică (care e o proteină) de atacul enzimelor proteolitice — de digestie peptică. Sub acțiunea alcalilor diluați, mucinele se scindează în două componente : o componentă proteinică și o componentă complexă cu caracter neproteic, acid : acidul mucoitinsulfuric. Acidul mucoitinsulfuric, sub acțiunea acizilor, se hidrolizează în acid sulfuric și mucoitină ; aceasta din urmă, sub acțiunea acizilor, se hidrolizează în acid acetic și mucozină, iar mucozina la rândul ei se scindează în acid d-glicuronic și d-glucozamină.



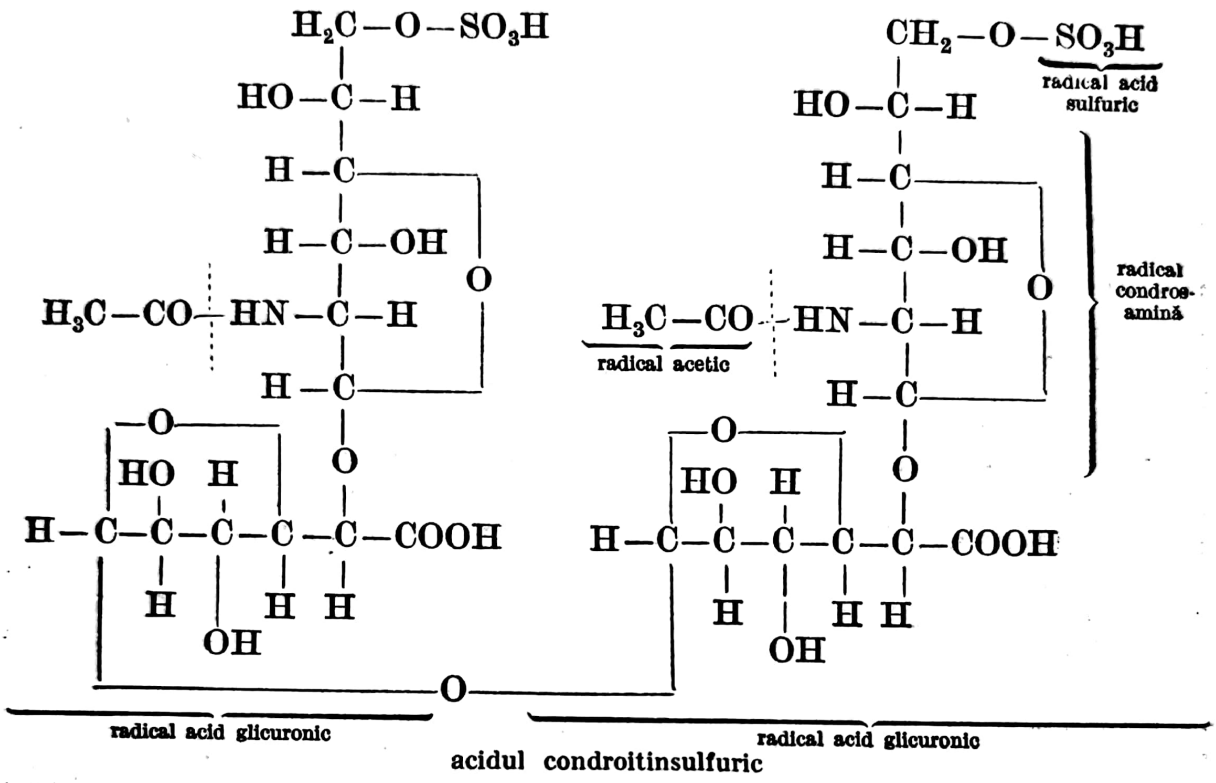
Nu toate mucinele au exact aceeași structură.

Heparina, substanță cu puternică acțiune anticoagulantă, face parte din grupa mucinelor (se găsește în ficat și în alte organe, la lipitori).

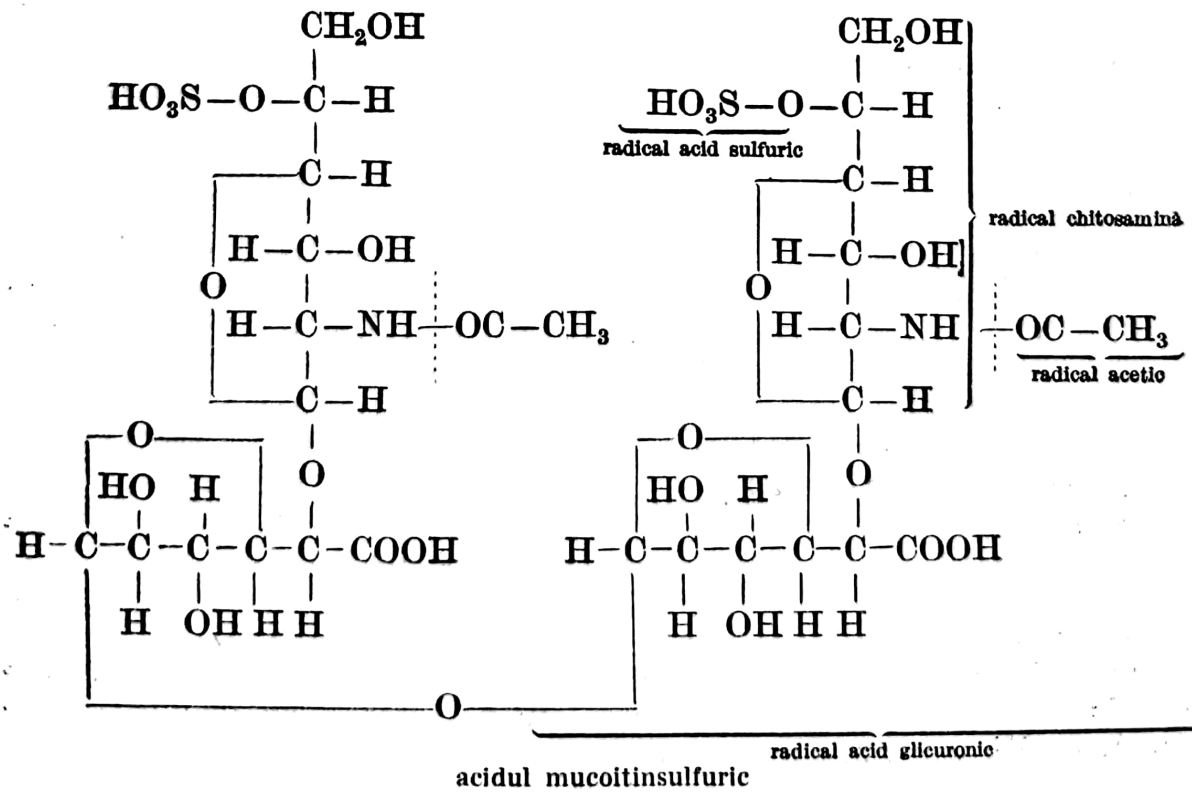
2. **Condroidele** au ca grupare prostetică acidul condroitinsulfuric, care conține, în loc de glucozamină, condrosamina. Acidul glicuronic este unit glicozidic cu aminozaharul din moleculă ; radicalul acetic este legat de gruparea NH_2 sub forma unei grupări acetil, iar acidul sulfuric esterifică -OH din aminozaharuri (vezi formulele).

Scanned with OKEN Scanner

Amiloidul, substanță care apare în anumite cazuri patologice în organe, constituind așa numita „degenerescență amiloidă" aparține grupei condroproteidelor — numele de amiloid fiind datorit coloratiei cărămizii pe care o dă cu iodul:



acidul condroitinsulfuric



acidul mucoitinsulfuric

Scanned with OKEN Scanner

III. Nucleoproteidele

Nucleoproteidele sunt heteroproteide constituite dintr'o proteină şi o grupare prostetică formată din acizi nucleici puternic polimerizaţi. Nucleoproteinele sunt astfel proteine conjugate. Proteina funcţionează în aceşti compuşi ca o bază; este probabil că în compoziţia ei predomină arginina, histidina şi lizina. Acizii nucleici au funcţie de acid. Nucleoproteidele apar astfel ca săruri ale acizilor nucleici.

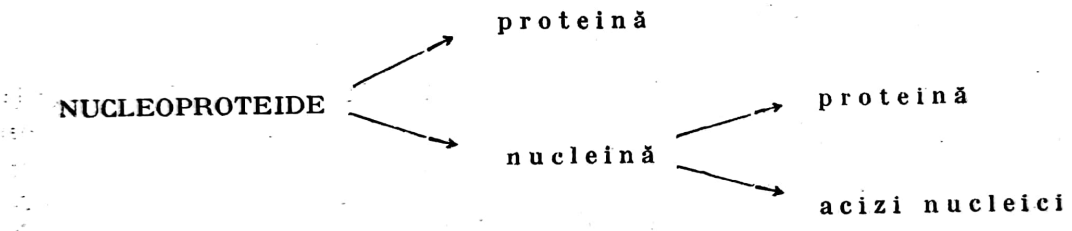
Structura nucleoproteidelor

Structura nucleoproteidelor este complexă. Ea a fost lămurită cu ajutorul hidrolizei acide, bazice şi enzimatice a acestor compuşi.

Hidroliza enzimatică sub acţiunea pepsinei duce la separarea unei fracţiuni proteinice şi a unei alte componente, de natură complexă, nucleina. Nucleina este formată la rândul ei din acizi nucleici plus o altă fracţiune proteinică.

Hidroliza enzimatică sub acţiunea tripsinei separă din nucleină cealaltă fracţiune proteică şi acizii nucleici.

Structura nucleoproteidelor se poate schematiza astfel;



1. **Proteina din molecula nucleoproteidelor** aparţine în general grupei histonelor şi protaminelor. Cercetătorul sovietic Belozerschi a arătat că există nucleoproteide care au în moleculă albumine sau globuline, deci proteine cu moleculă mare. Natura legăturii acestei proteine în molecula mare a nucleoproteidelor nu se cunoaşte cu precizie. Caracteristicile chimice şi fiziologice ale nucleoproteidelor sunt date în special de gruparea lor prostetică, de acizii nucleici din moleculă.

Există două tipuri de acizi nucleici, deci două tipuri de nucleoproteide. Acizii nucleici au o structură complexă — nu sunt compuşi unitari. Vor fi astfel studiate separat fiecare din componentele care intră în structura lor.

2. **Acizii nucleici** sau acizii nucleinici sunt eliberaţi din nucleoproteidele corespunzătoare, prin hidroliză slabă (alcalină, acidă sau enzimatică). Conţin C, H, O, N, şi P. P este o componentă caracteristică, folosită pentru identificarea lor; se găseşte în general în proporţie de 8—14%.

Acizii nucleici sunt greu solubili în apă rece, mai uşor solubili în apă caldă, insolubili în alcool, uşor solubili în alcali slabi, cu care formează săruri alcaline solubile. In stare foarte pură nu dau reacţiile de culoare ale proteinelor. Sunt compuşi cu structură macromoleculară, sunt polimeri înalţi. Particulele lor moleculare sunt alungite sub forma de bastonaşe, fiecare fiind constituit din agregate de unităţi mai mici. Determinări ale greutăţii lor moleculare indică valori care pot varia între 200 000 — 1 000 000 (metoda ultracentrifugării). Cu coloranţii bazici

Scanned with OKEN Scanner

formează săruri insolubile şi colorate. Pe această proprietate se bazează colorația histologică a nucleilor celulari, în compoziția cărora predomină acizii nucleici.

Există mai mulți acizi nucleici, dar pot fi grupați în două tipuri:

α. acizii ribonucleici, ARN, cunoscuți înainte şi sub numele de acizi nucleici vegetali sau acizi zimonucleici, deoarece au fost extraşi prima oară din drojdia de bere, şi

β. acizi desoxiribonucleici, ADRN, cunoscuți înainte şi sub numele de acizi timonucleici sau acizi nucleici animali, extraşi pentru prima oară din timus. Structura generală a acestor două tipuri de acizi nucleici este însă aceeaşi; prin hidroliză totală eliberează componenții lor de bază, şi anume:

acidul ortofosforic

o componentă glucidică şi

o bază azotată, care poate aparține heterociclului purinic sau pirimidinic.

Hidroliza acizilor nucleici se poate realiza cu ajutorul acizilor minerali slabi, a enzimelor din sucul intestinal sau a enzimelor din extractele tisulare.

Foarte schematic, structura acestor componente se poate reprezenta astfel:

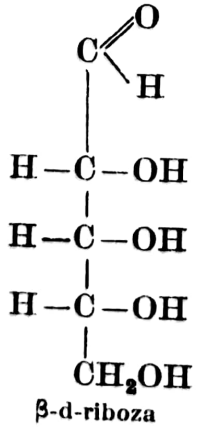
ACID NUCLEIC → acid o-fosforic
ACID NUCLEIC → glucide
ACID NUCLEIC → bază azotată

Schema aceasta simplă se repetă de un număr *n* de ori în molecula acidului nucleic. Ea constitue *un mononucleotid*, acidul nucleic fiind un polimer de mononucleotide (conține un număr *n* de mononucleotide). Mononucleotidul constitue astfel unitatea structurală a acizilor nucleici.

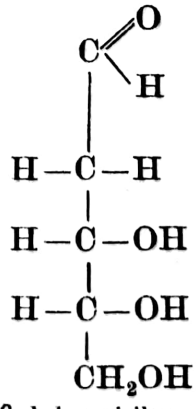
Vom analiza fiecare componentă din molecula mononucleotidului în parte şi ulterior complexul format din mononucleotide, acidul nucleic.

Acidul fosforic din molecula mononucleotidului este acid ortofosforic PO_4H_3. El conferă acizilor nucleici caracterul lor acid: reacție acidă în soluție şi capacitatea de a forma săruri cu baze minerale şi organice. Acizii nucleici apar ca esteri fosforici ai N-glicozidelor sau ai unor baze azotate.

Componenta glucidică este o pentoză, şi anume d-riboza în acizii ribonucleici şi desoxiriboza sau timinoza sau d-2-ribodezoza în acizi desoxiribonucleici. Pentozele acestea sunt aldopentoze şi au structură furanozică.

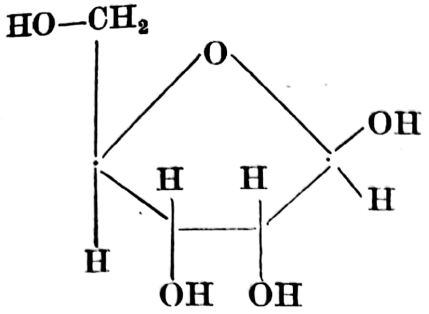


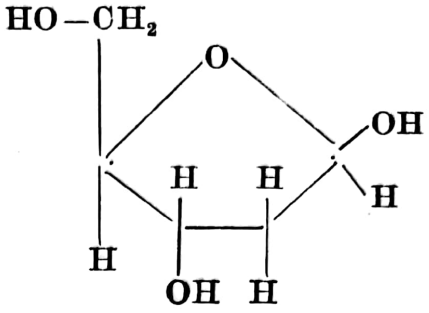
β-d-riboza



β-d-desoxiriboza
(d-ribodezoza) (timinoza)

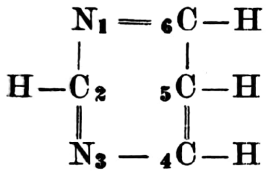
Scanned with OKEN Scanner

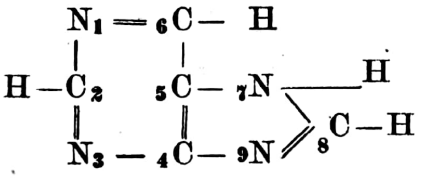

β-d-ribofuranoza


β-d-2-desoxiribofuranoza

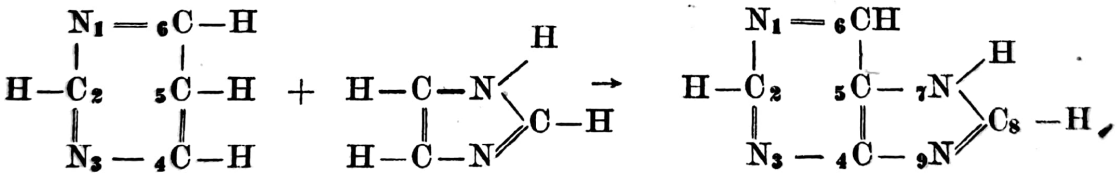
Diferența cea mai caracteristică dintre cele două tipuri de acizi nucleici o face componenta glucidică. Prezența acesteia conferă nucleoproteidelor proprietatea de a da cu fuxina bisulfurică incoloră (leuco) coloratia roșie caracteristică aldozelor. Reacția histologică a cromozomilor (reacția Feulgen) e datorită nucleoproteidelor din cromozomi.

Bazele azotate aparțin heterociclurilor pirimidinice sau purinice. Pirimidina se știe că este un ciclu cu 2 N, iar purina un ciclu cu *4 N*:


pirimidină

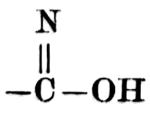
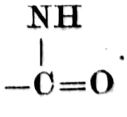

purină

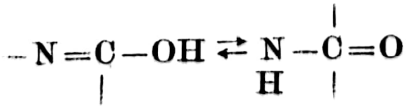
Purina se poate considera ca derivând din ciclul pirimidinic, prin condensare cu ciclul imidazolului:


pirimidină imidazol purină

Bazele azotate din molecula acizilor nucleici sunt derivați ai acestor cicluri. Pentru a putea preciza locul de substituire a diverselor grupări chimice fixate la atomii acestor cicluri, se notează atomii cu numere dela 1—6, respectiv, la ciclul purinic, dela 1—9. Derivații aceștia pot rezulta prin substituirea de grupări OH, aminice (NH_2), metilice.

Acești derivați pot apărea sub două forme tautomere, forma enolică sau forma lactim:

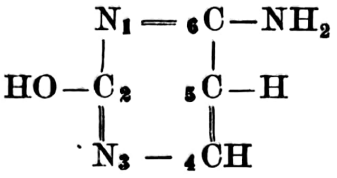

și forma *cetonică* sau lactam:




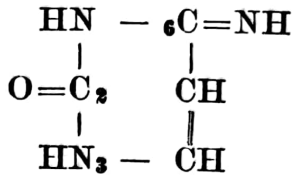
Formele „lactim" pot funcționa ca acizi, deoarece H oxidrilic poate fi înlocuit cu metale, formând săruri care servesc la separarea lor. Trecerea dela o formă la alta este rapidă și reversibilă.

α) **Bazele pirimidinice** din structura acizilor nucleici sunt: citozina, uracilul și timina.

Citozina este 2-oxi-6-aminopirimidina, are deci în moleculă o grupare OH la C_2 și o grupare NH_2 (amină) la carbonul 6:

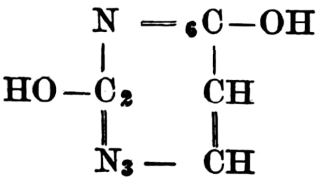


citozina (forma lactim)

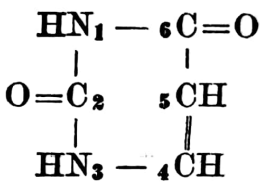


citozina (forma lactam)

Uracilul este 2-6-dioxipirimidina:

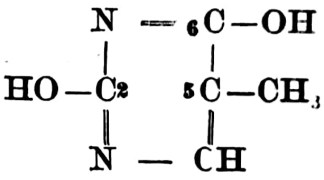


uracilul (forma lactim)

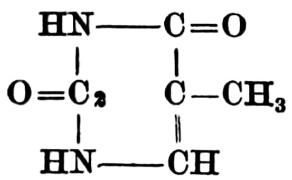


uracilul (forma lactam)

Timina este 2-6-dioxi-5-metilpirimidina:



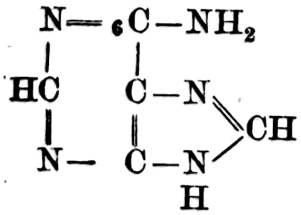
timina (forma lactim)



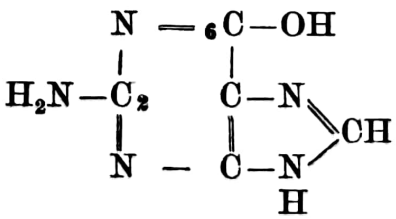
timina (forma lactam)

β) **Bazele purinice** conțin ciclul purinic. Se cunosc două baze purinice care intră în structura acizilor nucleici, și anume adenina și guanina:

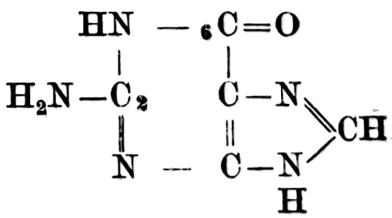
adenina este 6-aminopurina, iar guanina (fig. 24) 2-amino-6-oxipurina



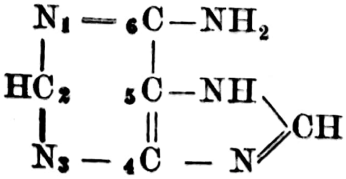
adenina (6-aminopurina)



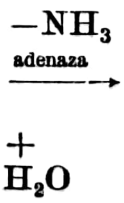
guanina (forma lactim enolică)

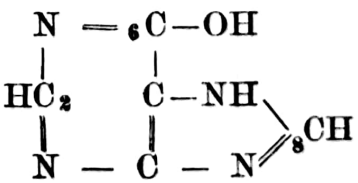


guanina (forma lactam, cetonică)



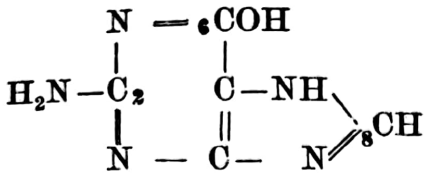
adenina (6-aminopurina)



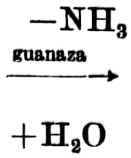


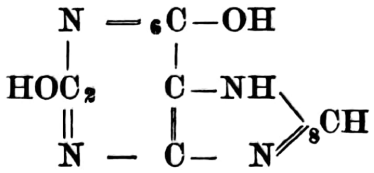
hipoxantina (6-oxipurina)

Scanned with OKEN Scanner



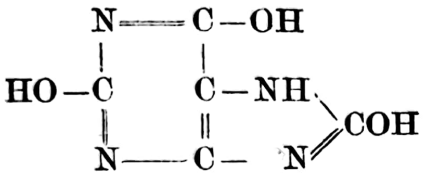
guanina (2-aminooxipurina)



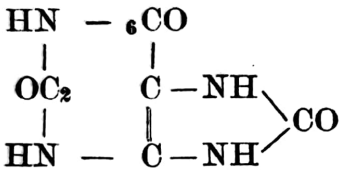


xantina (2,6-dioxipurina)

Trecerea dela adenină şi guanină la acid uric



acid uric (forma lactim)



acidul uric
(2, 6, 8-trioxipurina) (forma lactam)

Bazele azotate care intră în structura acidului ribonucleic sunt adenina şi guanina ca baze purinice, citozina şi uracilul ca baze pirimidinice. In acidul desoxiribonucleic, uracilul este înlocuit cu timina.

Deoarece în organismul uman şi la maimuţele antropoide produsul final de degradare a bazelor purinice este acidul uric, este interesant de a urmări legătura genetică dintre acestea (vezi formulele). Din adenină (6-aminopurina), sub acţiunea unei enzime, *adenaza*, rezultă 6-oxipurina sau *hipoxantina*, printr'un proces de desaminare; hipoxantina, prin oxidare, trece în 2-6-dioxipurina sau *xantina* (fig. 25), iar aceasta printr'o nouă oxidare trece în 2-6-8-trioxipurina sau *acidul uric*.

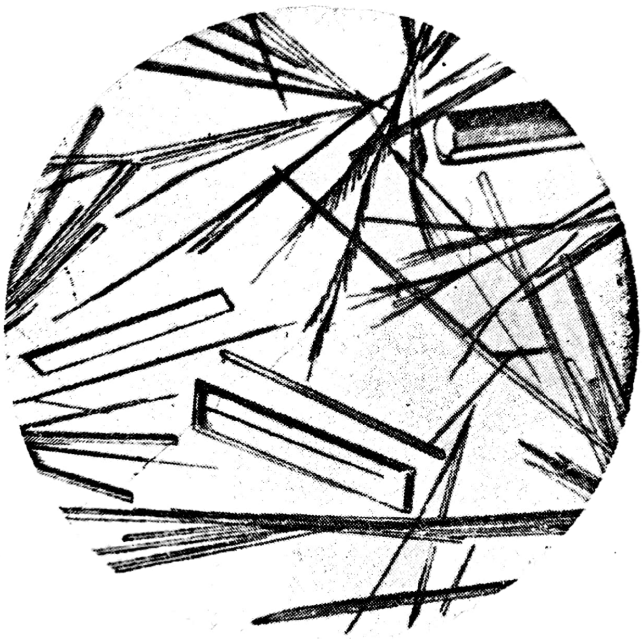


Fig. 24 Clorura de guanină

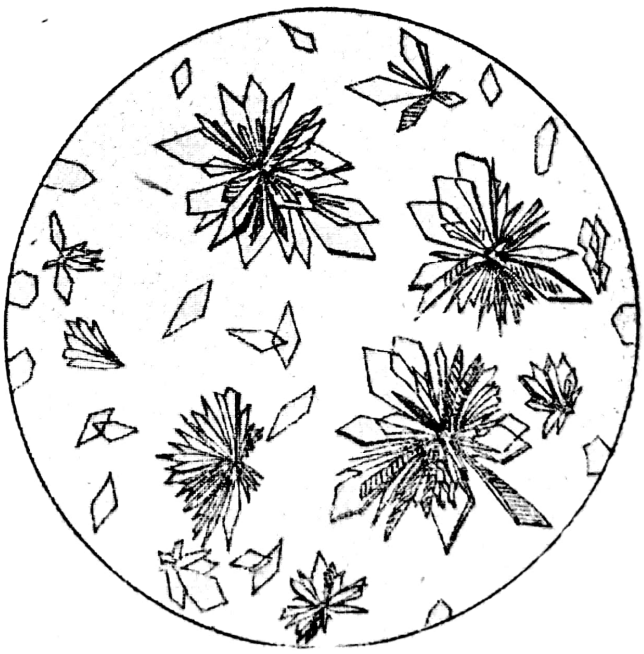


Fig. 25. Xantina

Scanned with OKEN Scanner

Din guanină, sub acţiunea unei alte enzime specifice, tot de desaminare, *guanaza*, rezultă direct 2-6-dioxipurina sau xantina, din care prin aceeaşi cale de oxidare rezultă acidul uric Acidul uric poate să existe sub forma lactim şi lactam; cea lactam e mai labilă (vezi formulele).

Acidul uric apare ca un produs de degradare a nucleoproteidelor la om şi maimuţele antropoide; se elimină prin urină; xantina şi hipoxantina se găsesc ca atare şi în fecale. Derivaţi purinici interesanţi din punct de vedere farmacologic sunt derivaţii de xantină şi anume: *teofilina* (1-3-dimetilxantina), *teobromina* (3-7-dimetilxantina) şi *cafeina* (1-3-7-trimetilxantina), care se găsesc în cafea, ceai, cacao. Vitamina B_1 vom vedea că este un derivat pirimidinic.

Derivaţii purinici sunt identificaţi în laborator prin aşa numită reacţie a *murexidei* sau aloxurică: apariţia unei coloraţii roşii-purpurii, în urma oxidării purinelor cu clor sau acid azotic şi tratare ulterioară cu amoniac.

Reacţia ar fi:

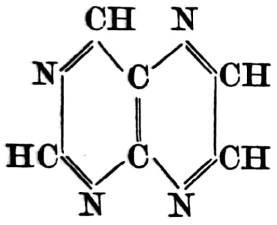
PURINE $\xrightarrow[\text{oxidare}]{}$ acid uric $\xrightarrow[\text{oxidare}]{}$ aloxan $\longrightarrow$ aloxantina

$\downarrow$

coloraţie roşie cu NH_3 (purpurat de amoniu sau murexida)

Purinele dau cu metalele Ag, Cu, săruri insolubile.

Compuşi biologici importanţi, având analogie de structură cu purinele, sunt *pterinele*. Conţin în moleculă un nucleu pteridinic homolog nucleului purinic; o pterină, şi anume *xantopterina* (amino-2-dihidroxi-6-8-pteridina) ar fi componenta unei vitamine din grupa vitaminelor B şi anume, a acidului folic. Pterinele au proprietăţi oxidoreductoare şi e probabil că datorită acestora au rol fiziologic important în diverse metabolisme. Xantopterina ar avea la vertebrate un rol analog riboflavinei. Ar interveni în metabolismul oxidativ al aminoacizilor şi purinelor.



nucleu pteridinic

Cunoscând componentele mononucleotidelor, şi anume acidul o-fosforic, componenta glucidică şi bazele azotate, putem trece la studiul mononucleotidelor şi apoi la analiza combinării acestor mononucleotide în molecula mare a acizilor nucleici.

Mononucleotidele

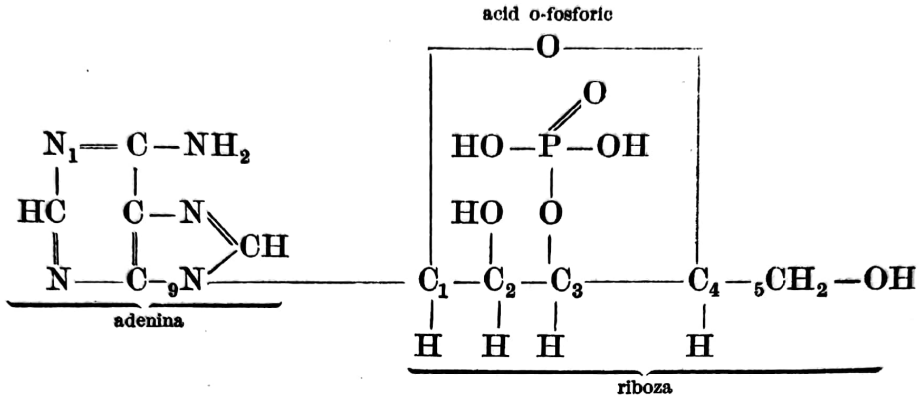
Mononucleotidele conţin în molecula lor o moleculă de acid o-fosforic, o moleculă de pentoză şi o bază purinică sau pirimidinică. Rezultă prin hidroliza menajată a acizilor nucleici (sub acţiunea enzimelor digestive sau a unor reactivi speciali). Se cunosc până acum 4 mononucleotide izolate din acidul ribonucleic: *acizii adenilic* şi *guanilic*, care conţin baze purinice, sunt deci mononucleotide purinice şi *acizii citidilic şi uracilic*, care conţin baze pirimidinice, sunt deci mononucleotide pirimidinice. Din acidul desoxiribonucleic s'a izolat, în loc de acid uracilic, *acidul timozinic*.

In mononucleotidele purinice, radicalul pentoză e fixat la atomul 3 din ciclul purinic, la cele pirimidinice la atomul 4 din ciclul pirimidinic.

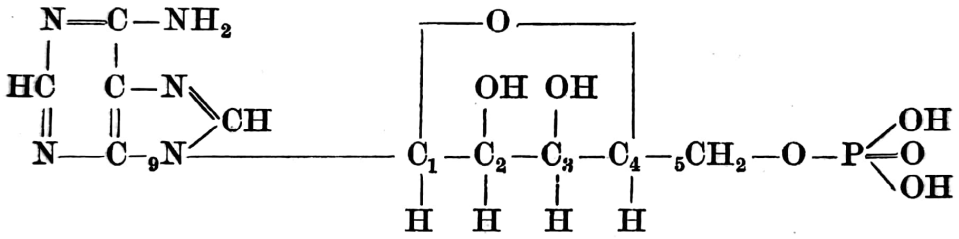
Mononucleotidele purinice, în afară că intră în structura acizilor nucleici, se găsesc în natură şi sub formă liberă, având un rol biologic extrem

Scanned with OKEN Scanner

de important. Astfel este *acidul adenilic* din mușchi și din drojdia de bere cu rol important în degradarea glucidelor și în procesul contracției musculare. Acidul adenilic din levură și acela din mușchi nu au structură identică; sunt substanțe izomere care diferă între ele prin poziția radicalului fosforic în moleculă, și anume, la cel din levură, acest radical este fixat la carbonul 3 din molecula ribozei, la cel din mușchi la carbonul 5 din molecula ribozei :

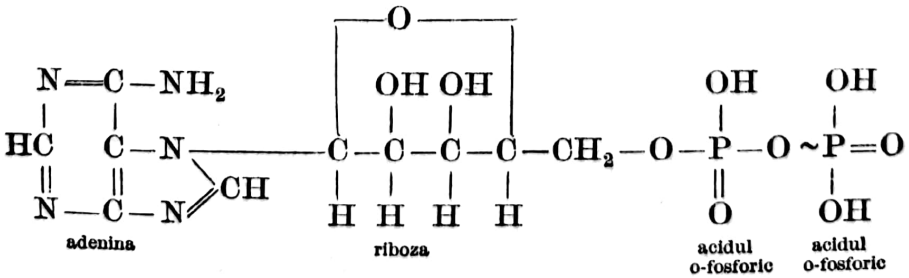


acidul adenilic din levură
(9-adenin-3-fosforibofuranozid)



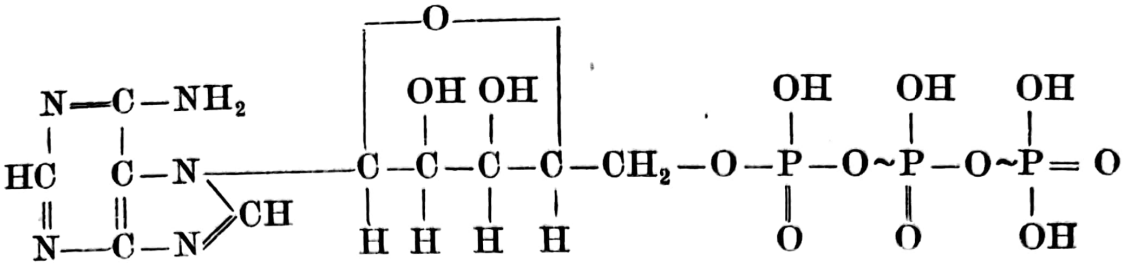
acidul adenilic din mușchi
(9-adenin-6-fosforibofuranozid)

Acidul adenilic, numit și acid adenozinmonofosforic AMF sau AA, se mai poate combina cu o moleculă de acid o-fosforic și formează acidul *adenozindifosforic* ADF, cu o moleculă de acid pirofosforic $P_2O_7H_2$, cu formare de acid *adenozintrifosforic* ATF. Toți trei compușii vom vedea că au rol important în procesul contracției musculare. Pot trece cu ușurință unul în altul prin fixare sau cedare de radical fosforic, joacă astfel rol de transportori de acid fosforic în degradarea glucidelor în mușchi și levură și în același timp de transportori de energie :



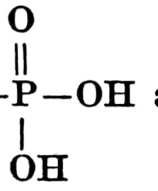
acidul adenozindifosforic (ADF)

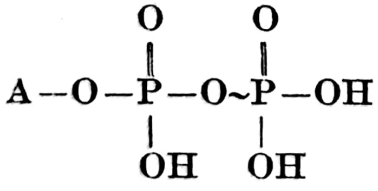
Scanned with OKEN Scanner



acidul adenozintrifosforic (ATF)

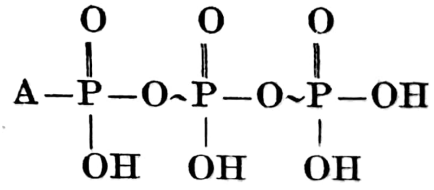
Acizii adenilici joacă un rol important în energetica celulei vii. Radicalii fosforici terminali fixați la acidul adenozintrifosforic (ATF) şi la acidul adenozindifosforic (ADF) sunt legaţi prin legături puternic energetice care, prin hidroliză, se desfac cu eliberare de energie mare (10 000 — —12 000 cal/gr/mol fosfat eliberat, în comparaţie cu 2 000—3 000 cal/gr/mol fosfat eliberat prin desfacerea unei legături fosfat de tip esteric obişnuit, legături slab energetice). Legăturile acestea puternic energetice, aşa numitele legături macroergice, se găsesc la o serie de compuşi (fosfocreatina, fosfopiruvatul, pirofosfaţii anorganici, în afară de ATF şi ADF), caracterizaţi prin aceea că radicalul fosforic nu este fixat aci printr'o simplă reacţie de esterificare a unei grupări alcoolice, ci prin intermediul azotului, ca în fosfocreatină, prin acela al grupării carboxilice, ca în fosfopiruvat (după cum vom vedea mai târziu) sau prin intermediul unei alte grupări fosfat, ca în cazul ATF-ului şi ADF-ului. Acest tip de legături au acumulate în stare potenţială rezerve energetice puternice. Se notează aceste legături puternic energetice cu semnul ~ (Lippmann) spre deosebire de legătura obişnuită, care se notează cu —·

Dacă notăm acidul adenilic cu  avem astfel :



acidul ADF

şi



acidul ATF

Acidul adenilic are şi alt rol important în organism, fiind componenta unor enzime (coenzima I şi II, fermenţii galbeni, etc.), după cum vom vedea la capitolele respective.

Prin desaminarea acidului adenilic, rezultă acidul inozinic, care conţine în locul bazei azotate adenina, compusul său de desaminare, hipoxantina. Acest proces de desaminare vom vedea că are loc în muşchi sub acţiunea unei desaminaze specifice.

Scanned with OKEN Scanner

Mononucleotidele pirimidinice nu se cunosc sub formă liberă în natură, ci numai sub formă de componente ale acizilor nucleici, de exemplu acidul *citidilic, uridilic* şi *timozinic.*

Nucleozidele

Rezultă din nucleotide prin desfacerea radicalului o-fosforic, sunt formate deci dintr'o bază purinică sau pirimidinică şi o pentoză (riboza sau desoxiriboza). Sunt astfel, glicozide ale bazelor azotate.

Se obţin cu uşurinţă din mononucleotide prin hidroliza alcalină sau sub acţiunea unor enzime a unor fosfataze specifice. Celor 5 mononucleotide izolate din acizii ribo -şi desoxiribonucleici le corespund 5 nucleozide, şi anume : *adenozina, guanizina, citidina, uridina* şi *timozina.* Ele se deosebesc de mononucleotide prin absenţa radicalului o-fosforic în moleculă. Adenozina este mai importantă, deoarece prin fosforilarea radicalului riboză dă AA.

Prin hidroliză acidă, mononucleotidele separă baza azotată (purinică sau pirimidinică), rămânând complexul pentoză — acid fosforic. Hidroliza acidă şi bazică indică deci că legătura cu baza purinică sau pirimidinică se face prin intermediul pentozei.

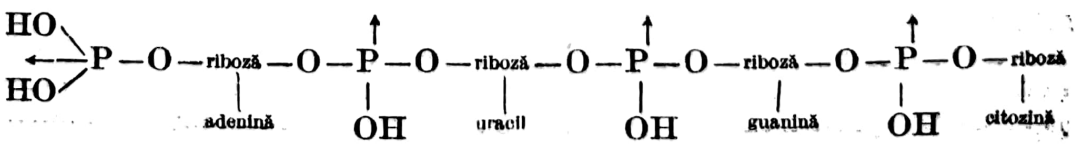
Nucleozidele ca şi nucleotidele corespunzătoare pot fi purinice sau pirimidinice.

Din ce se cunoaşte despre produsele de desfacere ale acizilor nucleici şi despre punctul unde se stabilesc legăturile dintre diversele componente ale acestor compuşi s'a ajuns la următoarea interpretare a moleculei acestora.

1. *Acizii nucleici sunt formaţi din mai multe mononucleotide,* sunt deci *polinucleotide.* Unitatea structurală de bază, atât a acizilor ribonucleici ARN, cât şi a celor desoxiribonucleici ADRN, este, după Levène, un tetranucleotid cu o greutate moleculară de aproximativ 1 200. Determinarea greutăţii moleculare a acidului timonucleic (500 000—1 100 000) a arătat că acesta ar cuprinde 2 000—3 000 de resturi de mononucleotide; acidul ribonucleic, mult mai puţin polimerizat, cuprinde 30 de resturi de mononucleotide. Se poate considera mononucleotidul drept componenta structurală de bază a acizilor nucleici, aşa cum ar fi aminoacizii la proteine.

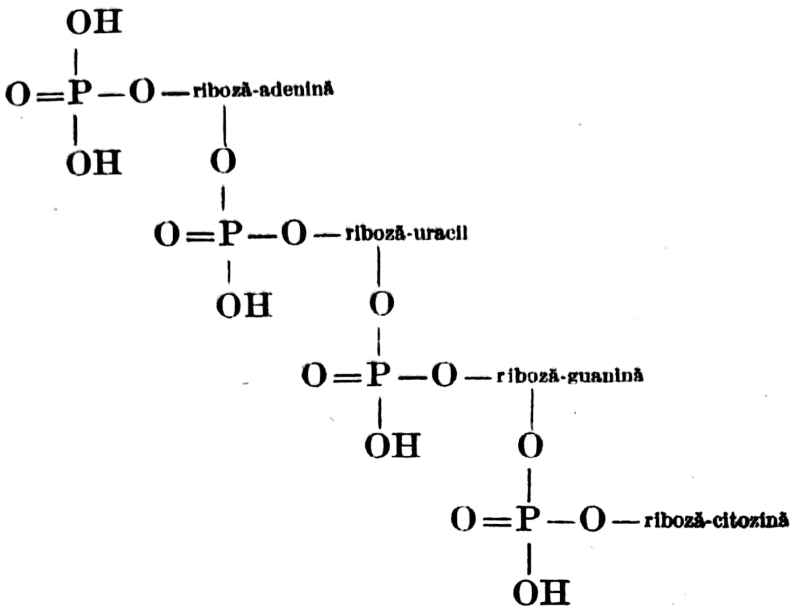
Enzimele de depolimerizare, desoxiribonucleaza şi ribonucleaza (depolimerazele) desfac molecula mare a acizilor nucleici în fragmente mici de mononucleotide.

2. *Orânduirea mononucleotidelor în molecula polinucleotidului* nu este încă bine cunoscută. După Levène, legătura dintre diversele mononucleotide s'ar face prin intermediul acidului o-fosforic, care esterifică molecula de pentoză a mononucleotidelor vecine :

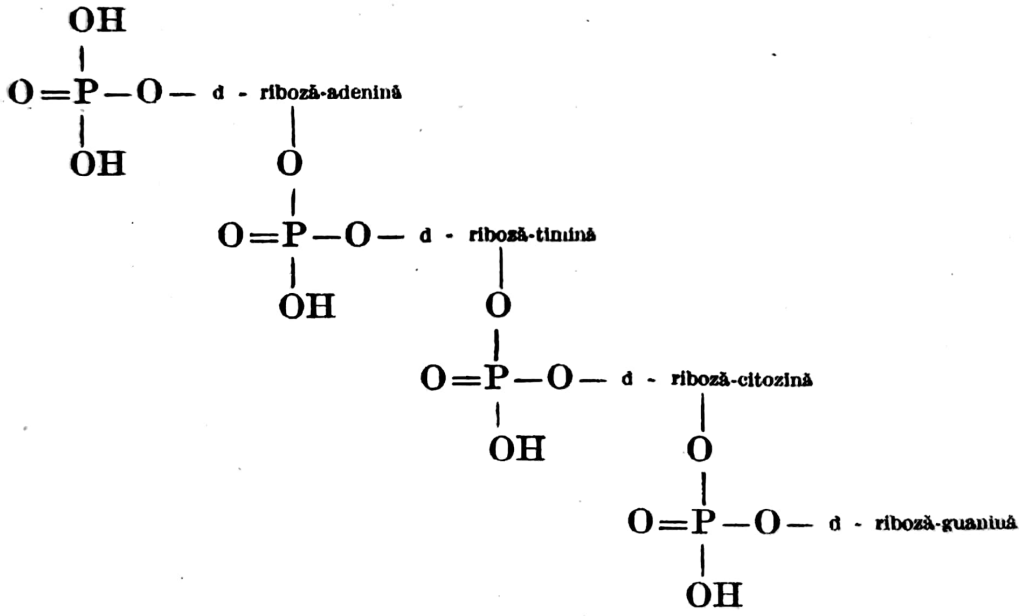


Scanned with OKEN Scanner

Pentoza unui nucleotid se unește cu acidul fosforic al nucleotidului vecin, formând grupe de câte 4 nucleotide cu următoarea structură:



acidul ribonucleic



acidul desoxiribonucleic (tetranucleotid)

$$(C_{39}H_{51}N_{15}P_4O_{25})$$

Acidul desoxiribonucleic ADRN se deosebește astfel de acidul ribonucleic ARN prin pentoza pe care o conține, desoxiriboza și prin baza pirimidinică timina în loc de uracil. Fiecare tetranucleotid din acidul nucleic conține două baze purinice și două baze pirimidinice.

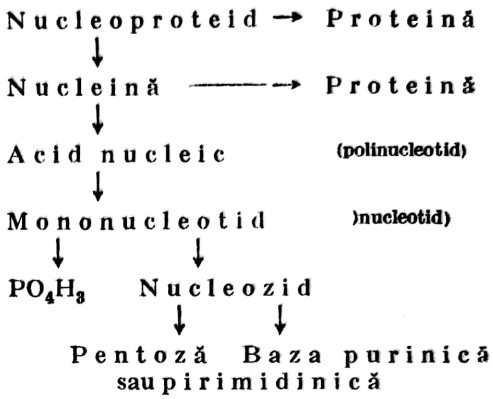
3. *Prin hidroliza acizilor nucleici se obțin mononucleotidele* (*nucleotidele*), precum și *nucleozidele corespunzătoare.*

In organism această scindare se face sub acțiunea enzimelor specifice, nucleazele și nucleozidazele. Schema dată de Levène pune în evidență punctul de legătură dintre pentoză și baza azotată a aceluiaș mononucleotid

Scanned with OKEN Scanner

pe de o parte şi punctul de legătură dintre pentoză şi acidul fosforic a două mononucleotide vecine. Ea explică dece o primă hidroliză pune în libertate mononucleotidul, o a doua aduce scindarea nucleozidului (pentoză + baza azotată) şi deabia a treia scindare pune în libertate baza azotată şi pentoza.

Aceste rezultate pot fi redate schematic astfel:



Acizii nucleici, prin caracterul lor amfoter (bazele azotate şi acidul o-fosforic), pot funcţiona ca sisteme tampon de mare sensibilitate. Datorită caracterului lor acid fixează coloranţii bazici şi metalele Fe, Hg (proprietate care este folosită pentru colorarea nucleilor celulari). O serie de mononucleotide, şi anume acizii adenilici, au rol fundamental ca donatori de grupări fosforice în procesul de degradare şi sinteză a glucidelor în celulă (levuri, ţesut muscular), precum şi în procesele energetice ale contracţiei musculare, aşa cum vom vedea la capitolele respective. Nucleotidele intră în structura unor enzime (codehidraze, ferment galben), a virusurilor (virusul mozaicul tabacului este o ribonucleoproteidă tipică).

Importanţa biologică a nucleoproteidelor.

Nucleoproteidele fac parte din toate celulele animale şi vegetale. Acidul desoxiribonucleic există în nucleul tuturor celulelor, în special în cromatina nucleului. Acidul ribonucleic este prezent în nucleoli şi citoplasmă, nu şi în nucleu.

Proprietatea celulelor de a se colora cu coloranţii bazici este datorită în mare măsură acizilor nucleici, şi anume, radicalilor de acid fosforic din molecula lor. Acidul ribonucleic se găseşte în microzomi.

Acidul desoxiribonucleic se găseşte în cromatină sub forma unei molecule filiforme puternic polimerizată; izolată, are o greutate moleculară de 1 000 000. In organism sunt depolimeraze capabile de a depolimeriza aceste molecule mari. Nucleoproteidelor li se atribue un rol de bază în sinteza proteinelor. Ţesuturile şi celulele în care au loc procese de creştere intensă sau în care se formează cantităţi mari de substanţe proteice sunt bogate în acid ribonucleic. Astfel, ţesuturile embrionare, neoformaţiunile maligne, plăgile pe cale de vindecare sunt bogate în acizi nucleici. Toate aceste ţesuturi, atât de diferite, au totuşi comun faptul că la nivelul lor se face o intensă sinteză a proteinelor. Există deci o corelaţie între cantitatea de acid ribonucleic şi sinteza proteinelor, lucru care a fost confirmat şi prin cercetările cu fosfor radioactiv introdus ca indicator. In timpul creşterii intense a celulelor are loc o încorporare a fosforului marcat în molecula acidului ribonucleic; cu acest prilej se constată o mare mobilitate a fosforului în timpul procesului de sinteză, în care intervine şi acidul ribonucleic. Pentru a explica acest fapt s'au emis trei ipoteze:

1. macromolecula acizilor nucleici serveşte drept bază structurală pentru formarea macromoleculei protidice;

2. acizii nucleici se unesc chimic cu proteinele sub formă de compuşi insolubili; pe măsura formării acestora, ei le scot astfel din soluţie. Pe baza legii acţiunii masselor, acest mecanism va dirija sensul reacţiei spre sinteză;

Scanned with OKEN Scanner

3. acizii nucleici participă direct la sinteza proteinelor ca sursă energetică directă.

După cercetătorii sovietici (Bressler), baza procesului ar fi următoarea : aminoacizii, printr'un proces de chemo-adsorbţie, sunt adsorbiţi de grupările fosforilate ale acidului ribonucleic, grupări care au acumulată o cantitate mare de energie.

Sub acţiunea fermenţilor proteolitici din celulă şi în condiţiile speciale ale stratului de aminoacizi adsorbiţi, procesul este plasat în sensul sintezei ; se produce o unire a acestora într'o macromoleculă polipeptidică. Desorbţia acestei macromolecule de pe suprafaţa de adsorbţie şi trecerea ei în soluţie cere aport de energie, energie care este dată prin desfacerea legăturilor fosforice din acizii nucleici. Lanţul polipeptidic se desface de pe suprafaţa polinucleotidului, trece în soluţii sub forma de proteină solubilă globulară şi radicalul fosforic este fixat din nou pe polinucleotid, iar procesul reîncepe.

În 1949, cercetătorul sovietic A. E. Braunştain a reuşit să sintetizeze unele di- şi tripeptide cu ajutorul donatorilor de grupări fosforice. El afirmă că sinteza proteinelor, proces fundamental în creşterea şi reproducerea celulei, se produce în întreaga celulă, atât în citoplasmă, cât şi în nucleu, şi socoteşte ca antiştiinţifică împărţirea celulei în „substanţă ereditară" a nucleului şi „substanţă nutritivă" a protoplasmei (concepţia weismanniştilor).

Cercetătorii sovietici socotesc că tot ce este viu, orice particulă a celulei, a organismului, şi nu numai cromozomii, posedă o ereditate. Ei mai socotesc că sinteza proteinelor, ca şi întregul metabolism, sunt supuse acţiunii condiţiilor exterioare : temperatura, concentraţia diferitelor substanţe, etc. Ele nu sunt permanente sau legate de vreo structură invariabilă care să se reproducă spontan, ci cauza iniţială care provoacă modificări în organism este condiţionată de împrejurările exterioare. Ereditatea este definită doar de tipul specific al metabolismului : „modificaţi tipul de metabolism al organismului viu şi veţi putea modifica ereditatea", spune Lâsenco, şi exprimă tema de bază a biologiei materialiste, indicând calea spre care trebue să se desvolte doctrina cu privire la biosinteza proteinelor (conform concepţiei şcolii biochimice sovietice).

IV. Cromoproteidele

Cromoproteidele sunt proteidele care au ca grupare prostetică o substanţă colorantă. Cromoproteidele se împart în două grupe mari :

I. *Cromoproteide* cu structură tetrapirolică sau cromoproteide *porfirinice* şi

II. *Cromoproteide neporfirinice.*

Aceste două grupe se împart la rândul lor în cromoproteide cu funcţie respiratorie şi cromoproteide fără funcţie respiratorie.

I. Cromoproteidele porfirinice cu funcţie respiratorie sunt :

1. *hemoglobinele,* pigmenţii feruginoşi caracteristici vertebratelor,
2. *citocromii,*
3. *fermentul roşu respirator* (al lui Warburg),
4. *catalazele* şi *peroxidazele,*

Scanned with OKEN Scanner

5. *cruorinele,* pigmenţii feruginoşi ai nevertebratelor. Cromoproteidele porfirinice fără funcţie respiratorie sunt :

1. *clorofilele,*

2. *ficocianinele* şi *ficoeritrinele* din algele albastre şi roşii.

II. Cromoproteidele neporfirinice cu funcţie respiratorie sunt : *hemeritrinele,* pigmentul feruginos al unor nevertebrate (*Sipuncul*), *hemocianinele,* pigmentul respirator din sângele crustaceelor, melcilor, moluştelor, conţin Cu în moleculă ;

flavoproteidele : fermentul galben respirator.

Cromoproteide neporfirinice fără funcţie respiratorie sunt : carotenoproteidele : purpura retiniană, *rodopsina.*

Ne vom ocupa numai de cele mai importante dintre ele şi dintre acestea, la acest capitol numai de hemoglobină. Citocromii, catalaza, peroxidaza se vor studia la capitolul enzimelor.

Hemoglobina

Hemoglobina este cromoproteida din sângele vertebratelor. In organismul acestor animale are rolul important de menţinere a rezervei de oxigen şi de transport al oxigenului necesar arderilor celulare. Hemoglobina are proprietatea importantă de a fixa reversibil oxigenul. In afară de aceasta mai intervine şi în menţinerea pH-ului sanguin (rol de reglare a echilibrului acido-bazic). Vom vedea acest lucru în detaliu la capitolul biochimiei sângelui.

Structura chimică a hemoglobinei. Prin hidroliză, hemoglobinele eliberează o grupare proteinică cunoscută sub numele de *globină* şi o grupare prostetică cunoscută sub numele de *hem.*

„Hemul" este componenta colorată din hemoglobină şi este aceeaşi pentru hemoglobinele diverselor specii de animale şi ale diverselor organe (sânge, muşchi) care le conţin.

Cele două componente ale hemoglobinelor naturale se pot recombina pentru a reforma hemoglobina naturală, dacă prin metoda utilizată nu s'a produs o denaturare. Prin hidroliză acidă la temperaturi joase (0°) se obţine globina nativă. Dacă globina a suferit totuşi o denaturare, recombinarea cu hemul nu duce la hemoglobina naturală, ci la un compus analog numit hemocromogen. Capacitatea hemoglobinelor de a fixa oxigenul depinde şi de componenta proteinică şi de hem ; fiecare componentă separat nu-l poate fixa. Complexul hemocromogen, care conţine globina denaturată, deasemenea nu-l poate fixa. Globina are deci un rol în fixarea oxigenului de către hem.

a) *Componenta prostetică a hemoglobinei. Structura hemului.* Hemul tuturor hemoglobinelor are aceeaşi structură ; este posibil să existe însă hemuri isomere. Hemul conţine fier bivalent Fe^{++} legat în complexul molecular. Hemoglobina apare astfel ca o *metalproteidă,* respectiv o *fier-proteidă.* Fierul bivalent din molecula hemoglobinei se oxidează însă cu extremă uşurinţă trecând în fier trivalent $Fe^{++} \rightleftarrows Fe^{+++}$ şi din acest motiv în experienţele de separare a hemului de globină se obţine componenta prostetică cu Fe^{+++} şi nu Fe^{++} ; aceasta poartă numele de *„hemină".* „Heminele" conţin deci fierul sub forma sa trivalentă, spre deosebire de „hem" care conţine Fe^{++}. Numai în condiţii de separare specială, anaerobă, se poate separa „hemul" intact cu Fe^{++}. Producerea de cristale de hemină

Scanned with OKEN Scanner

este de altfel frecvent utilizată ca test pentru decelarea sângelui, aceste cristale având o formă caracteristică. Separarea componentei prostetice de cea proteinică se face în stomacul animalelor sub acţiunea HCl din sucul gastric.

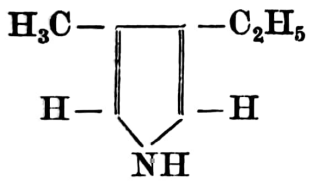
Studiul structurii hemului a fost făcut în general pe hemină, fiind mult mai uşor de obţinut sub această formă. Acest studiu a fost făcut prin cele două metode clasice ale chimiei organice: analiza şi sinteza.

Analiza componentelor din molecula heminei a fost făcută prin degradarea treptată a moleculei până la cele mai simple componente ale sale şi rezultatele obţinute au fost confirmate prin cea de a doua metodă.

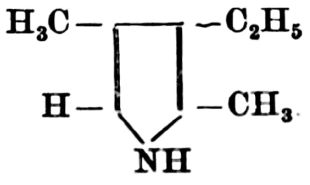
Sinteza moleculei din componentele sale a dat o serie de rezultate, cuprinse în schema de mai jos.

1. Prin tratarea hematinei cu acizi diluaţi şi micşorarea timpului de acţiune se separă din molecula acesteia fier metalic şi un complex conţinând 4 cicluri pirolice, un compus *tetrapirolic* cunoscut sub numele de *porfirină*. Deci, primul rezultat este următorul: *hemul e un derivat de porfirină conţinând fier*.

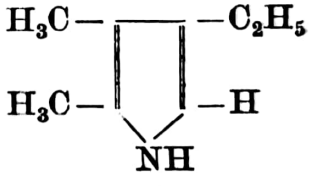
2. Prin reducere distructivă (descompunere reductivă) cu acid iodhidric se obţine un amestec de 8 componente şi anume: *4 baze pirolice* şi 4 *acizi pirolici* (vezi formulele): opsopirolul, criptopirolul, filopirolul, hemopirolul ca baze pirolice şi acizii opsopirolcarboxilic, criptopirolcarboxilic, filopirolcarboxilic, hemopirolcarboxilic, ca acizi.



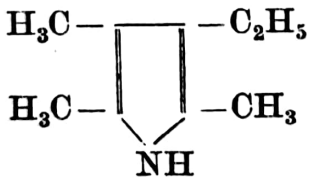
opsopirolul



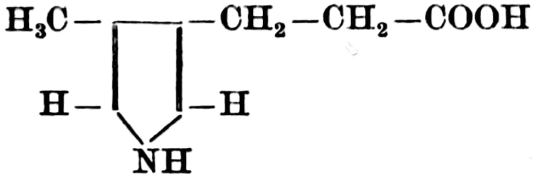
criptopirolul



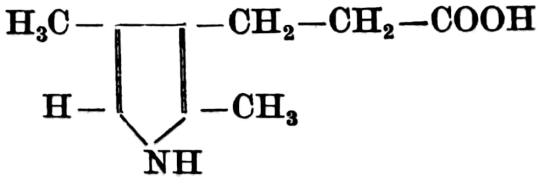
hemopirolul



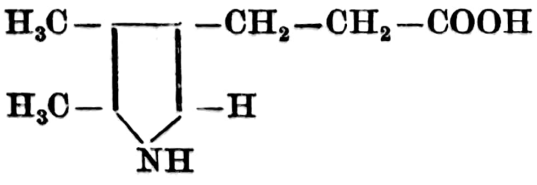
filopirolul



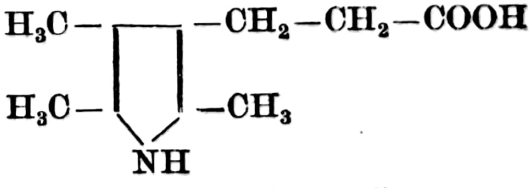
acid opsopirol-carboxilic



acid criptopirol-carboxilic



acid hemopirol-carboxilic

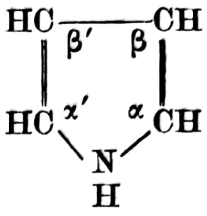


acid filopirol-carboxilic

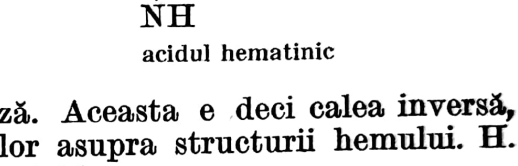
Scanned with OKEN Scanner

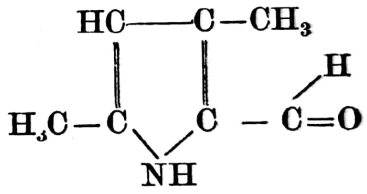
Al doilea rezultat al analizei a arătat că *hemul este un derivat de pirol* (pirolul, se ştie, e un heterociclu format din 5 atomi, din care unul e atomul de N :

3. Prin oxidare, descompunere oxidativă, se obţine din hemină un singur acid şi anume *acidul hematinic*, ceeace ar indica că acesta intră în structura hematinei, stabilind între grupările pirolice legături de tipul — CH = (radical metinic). Aceasta este deci a treia concluzie.

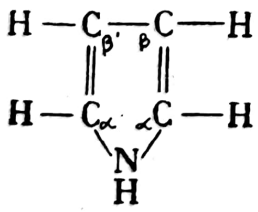

pirolul

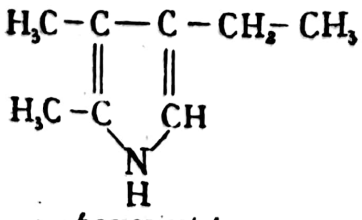
In rezumat, ca rezultat al acestor metode de analiză se poate afirma că : hematina, respectiv, hemul conţine în moleculă fier metalic, 4 nuclei pirolici, care formează porfirina şi că nucleii pirolici sunt legaţi între ei prin 4 grupe metenice = CH —. Hematina este deci un derivat de porfirină. Este o metalporfirină, în care metalul e fierul. Cunoaşterea structurii hemului se reduce astfel la cunoaşterea ciclului porfirinic. Porfirinele au ca substanţă de bază *porfina*, a cărei structură a fost stabilită de H. Fischer (1935) prin sinteză. Aceasta e deci calea inversă, care va duce la confirmarea cunoştinţelor asupra structurii hemului. H. Fischer a reuşit sinteza porfinei din pirolaldehidă sub acţiunea acidului formic. Se formează ciclul tetrapirolic al porfinei — din 4 molecule de pirolaldehidă condensate sub acţiunea acidului formic.

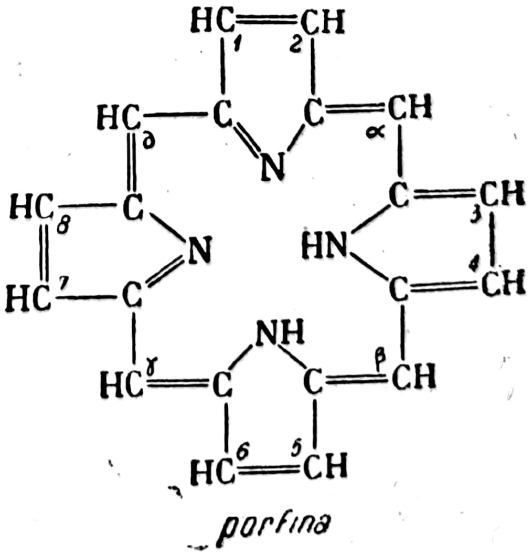

acidul hematinic


pirolaldehidă

In porfină, ciclurile pirolice sunt legate prin 4 punţi metenice — CH = şi stabilesc astfel un ciclu închis din 4 cicluri pirolice, N din acestea fiind orientat înspre interiorul ciclului tetrapirolic. Doi din aceşti N au fixat câte un H, care însă poate fi uşor înlocuit printr'un metal (Fe, Mg, Cu, Va); doi N sunt legaţi prin legături duble în ciclul pirolic corespunzător. Prin introducerea metalului în moleculă, însă, se pot stabili legături coordinative ale acestuia cu toţi 4 atomi de N :


pirolul


hemopirolul

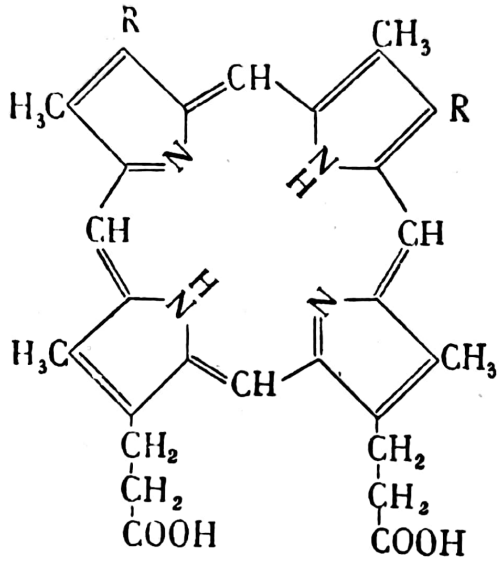

porfina

Scanned with OKEN Scanner

In ciclul porfinic, legăturile simple alternează cu legăturile duble, iar toate ciclurile pirolice sunt identice.

Porfirinele rezultă din porfină prin substituirea atomilor de hidrogen dela atomii de carbon 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 şi 8 cu diverşi radicali. Porfirinele au caracter de pigmenţi coloraţi şi diferă după natura radicalilor substituiţi. Porfirina care are legătură directă cu hemul poartă numele de *protoporfirină*. Protoporfirina are substituit la atomii 1, 3, 5 şi 8 câte un metil, la atomii 2 şi 4 radicalul vinil : $-CH=CH_2$, la atomii 6 şi 7 radicalul acidului propionic $-CH_2-CH_2-COOH$.

Protoporfirina este deci 1—3—5—8—tetrametil—2—4—divinil—6—7—diacid propionic-porfină.



Protoporfirina R = CH=CH$_2$
Hematoporfirina R = CHOH–CH$_3$
Mesoporfirina R = CH$_2$–CH$_3$
Coproporfirina R = CH$_2$–CH$_2$–COOH

Porfirinele mai cunoscute sunt :

Protoporfirina sau ooporfirina (acid porfin — 1, 3, 5, 8—tetrametil—2, —4—divinil—6, 7—dipropionic).

Deuteroporfirina (acid porfin—1,3, 5, 7— tetrametil-6, 7—dipropionic).

Coproporfirina (acid porfin—1, 3, 5, 7—tetrametil-2, 4, 6, 8—tetra-propionic).

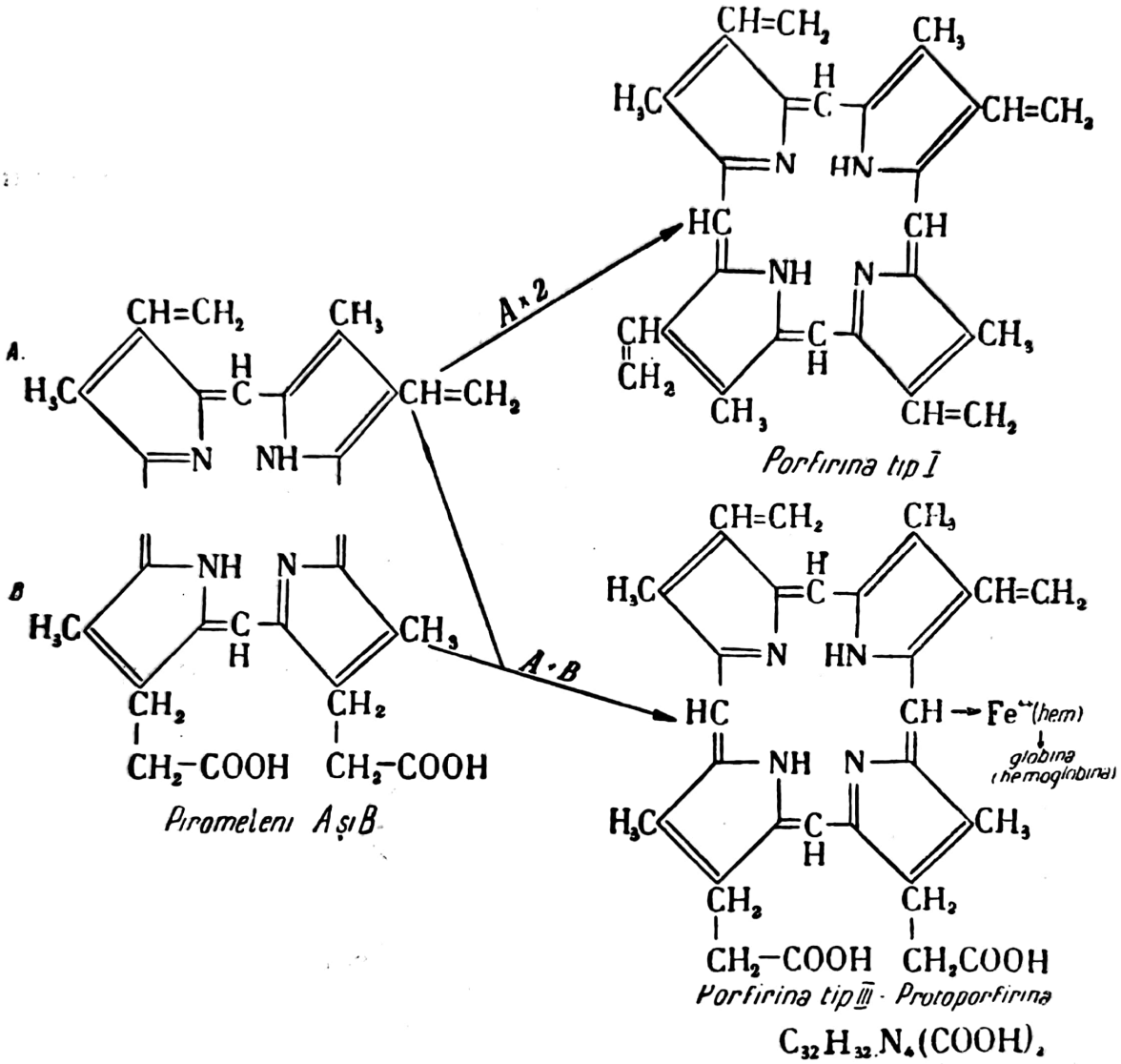
Uroporfirina (acid porfin—1, 3, 5, 7—tetrametil—2, 4, 6, 8—tetra-succinic).

Poziţia relativă a grupurilor substituite poate forma izomeri multipli corespunzători fiecăreia din aceste porfirine. Astfel, pentru coproporfirină există 4 izomeri posibili, după poziţia celor 4 grupuri metilice :

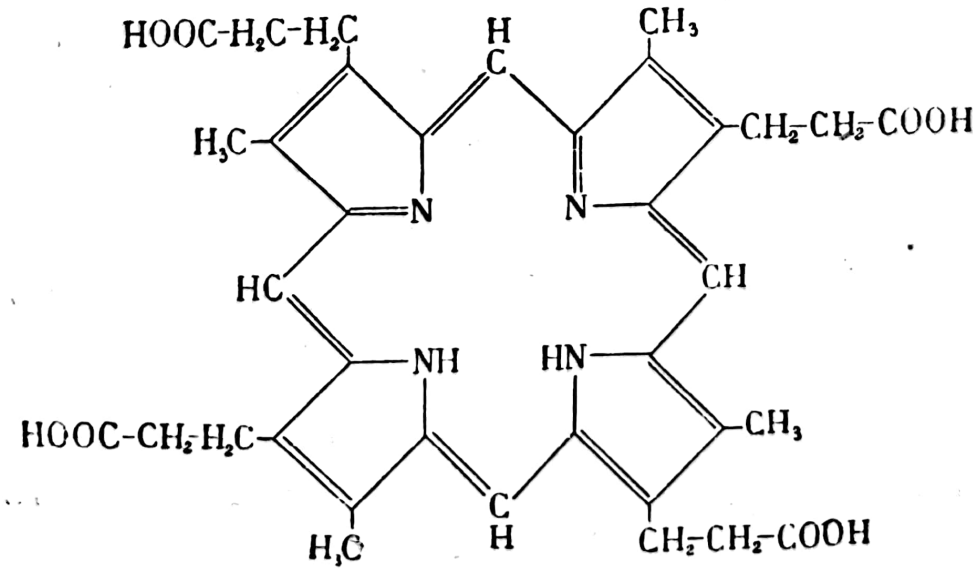
I : 1, 3, 5, 7 ; II :1, 4, 5, 8— III. 1, 3, 5, 8,— ; IV. 1, 4, 6, 7.

Scanned with OKEN Scanner

Formulele sunt :

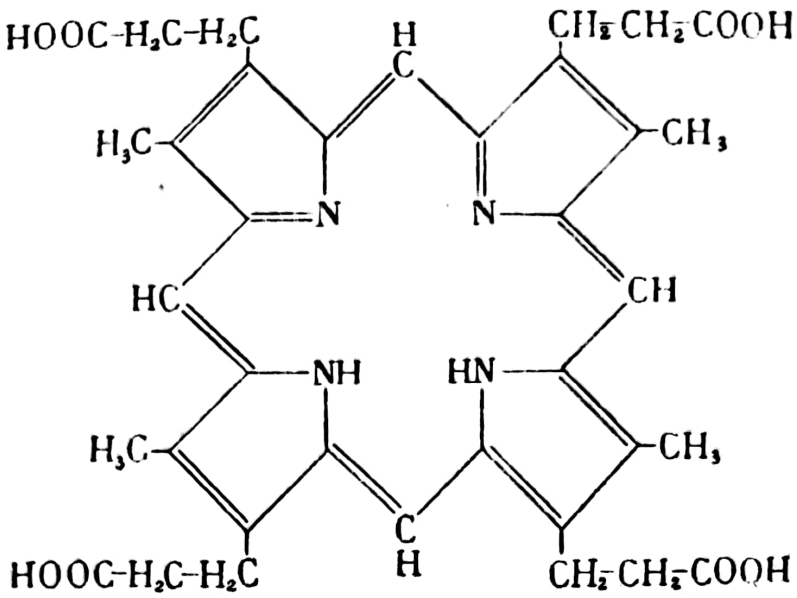


$C_{32}H_{32}N_4(COOH)_4$

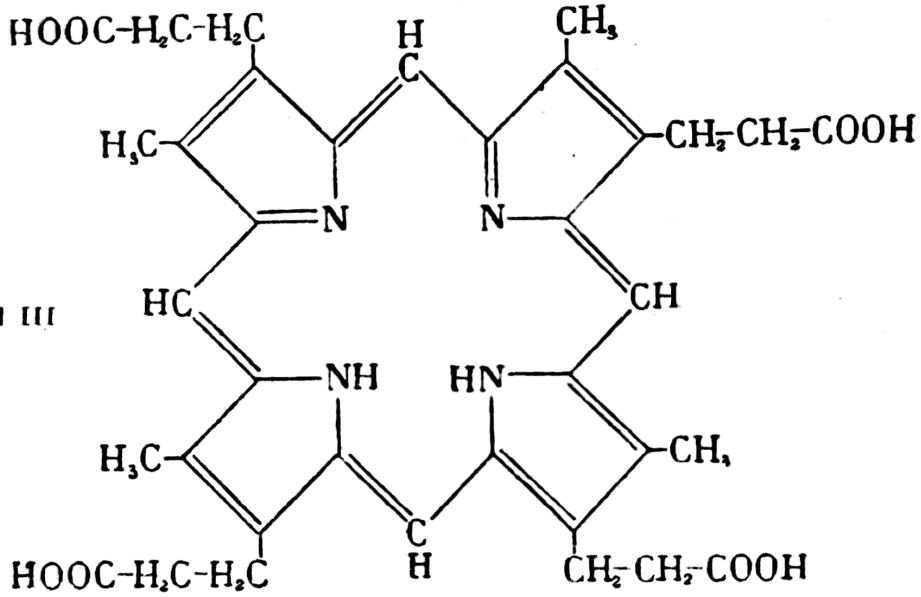


Izomerul I

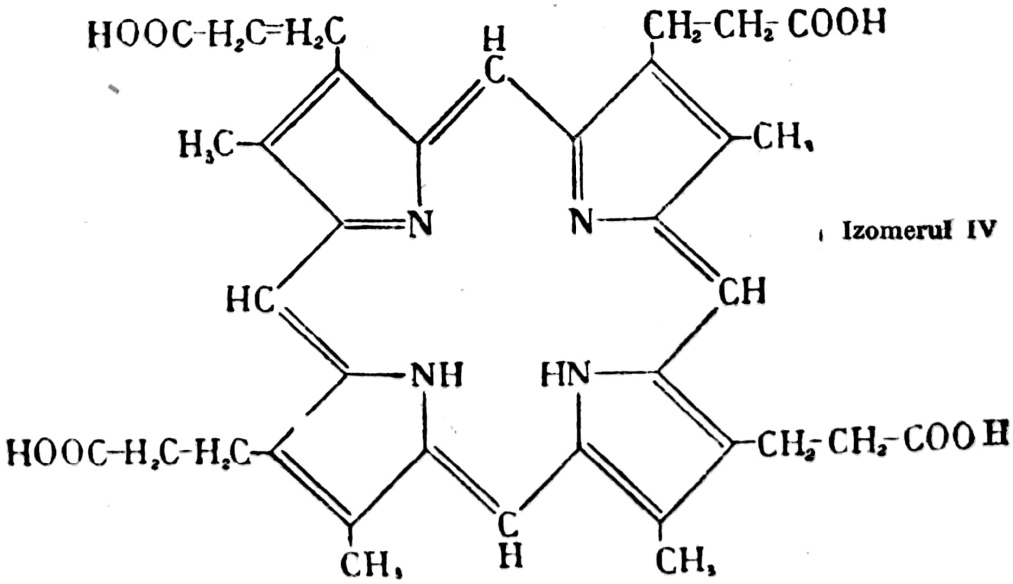
Scanned with OKEN Scanner



Izomerul II



Izomerul III



Izomerul IV

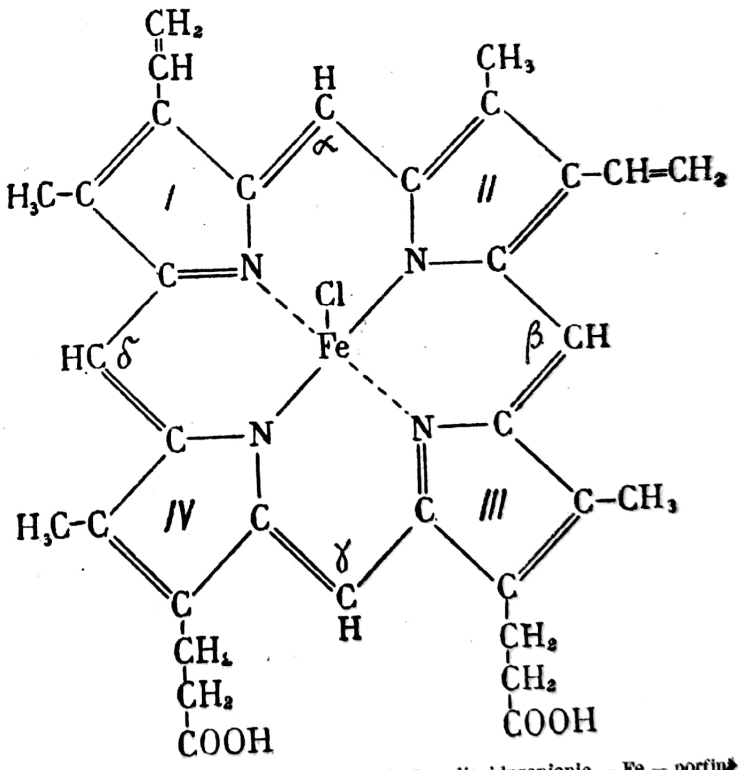
Scanned with OKEN Scanner

Poziția grupurilor metilice este importantă din punct de vedere biologic, pigmenții porfirinici din natură provenind fie din izomerul I (1, 3, 5, 7) fie din izomerul III (1, 3, 5, 8). Coproporfirina I din drojdie de bere, coproporfirina II și uroporfirina I care se elimină în unele cazuri patologice, derivă din Coproporfirina I. Hemoglobina, citrocromul b, catalaza, peroxidaza derivă din porfirina III.

Porfirinele se elimină ca atare prin urină și fecale în unele cazuri patologice (porfirinurie). Dacă în molecula protoporfirinei se înlocuesc cei 2 H mobili ai N cu Fe^{++}, se obține hemul, deci porfirina corespunzătoare hemului este protoporfirina, de unde și denumirea de *protohem* dată hemului din hemoglobină. Hemul (sau protohemul) este deci din punct de vedere chimic un derivat de porfină: 1—3—5—8—tetrametil—2—4-divinil—6—7-diacidpropionic — Fe^{++} —porfină.

Trecerea dela porfină la protoporfirină se face prin substituire de radicali la ciclurile pirolice, iar din protoporfirină la hem, prin introducerea de Fe^{++} în interiorul ciclului tetrapirolic. Deobicei, prin sinteză se obține *hemina*, adică un compus cu Fe^{+++}, deoarece Fe^{++} se oxidează cu extremă ușurință în Fe^{+++}.

In condiții anaerobe speciale, în absența totală a oxigenului, se obține Fe^{++} (hemul). Fierul este legat în ciclul tetrapirolic de atomi de N. In hemină fierul este trivalent Fe^{+++}; cea de a treia valență a Fe e în genere ocupată de un ion negativ care poate fi Cl^- (*clorhemina*) sau OH^- (*oxihemina* sau *hematina*), ambele deci conțin Fe^{+++}.



1, 3, 5, 8 tetrametil — 2, 4 — divinil — 6, 7 — diacidpropionic — Fe — porfină

Protohematina sau clorhemina

Hemul și hemina se pot uni cu ușurință cu substanțele cu caracter bazic, de exemplu cu globinele native, formând *hemoglobinele* diverse, sau cu globinele denaturate, formând așa numitele *hemocromogene* (fig. 26). Se pot deasemenea uni cu baze azotate, dând naștere la substanțe intens colorate, numite, din acest motiv, tot hemocromogene.

Toate hemoglobinele, de diverse proveniențe, conțin același hem, *protohemul*, derivat de fier al protoporfirinei.

Același protohem este gruparea prostetică și a altor metalproteide cu rol de enzime, și anume a catalazelor, a peroxidazelor, iar citocromii, pigmenți respiratori cu rol enzimatic, au ca grupare prostetică un hem apropiat de protohem (vom vedea acest lucru la capitolul enzimelor).

Scanned with OKEN Scanner

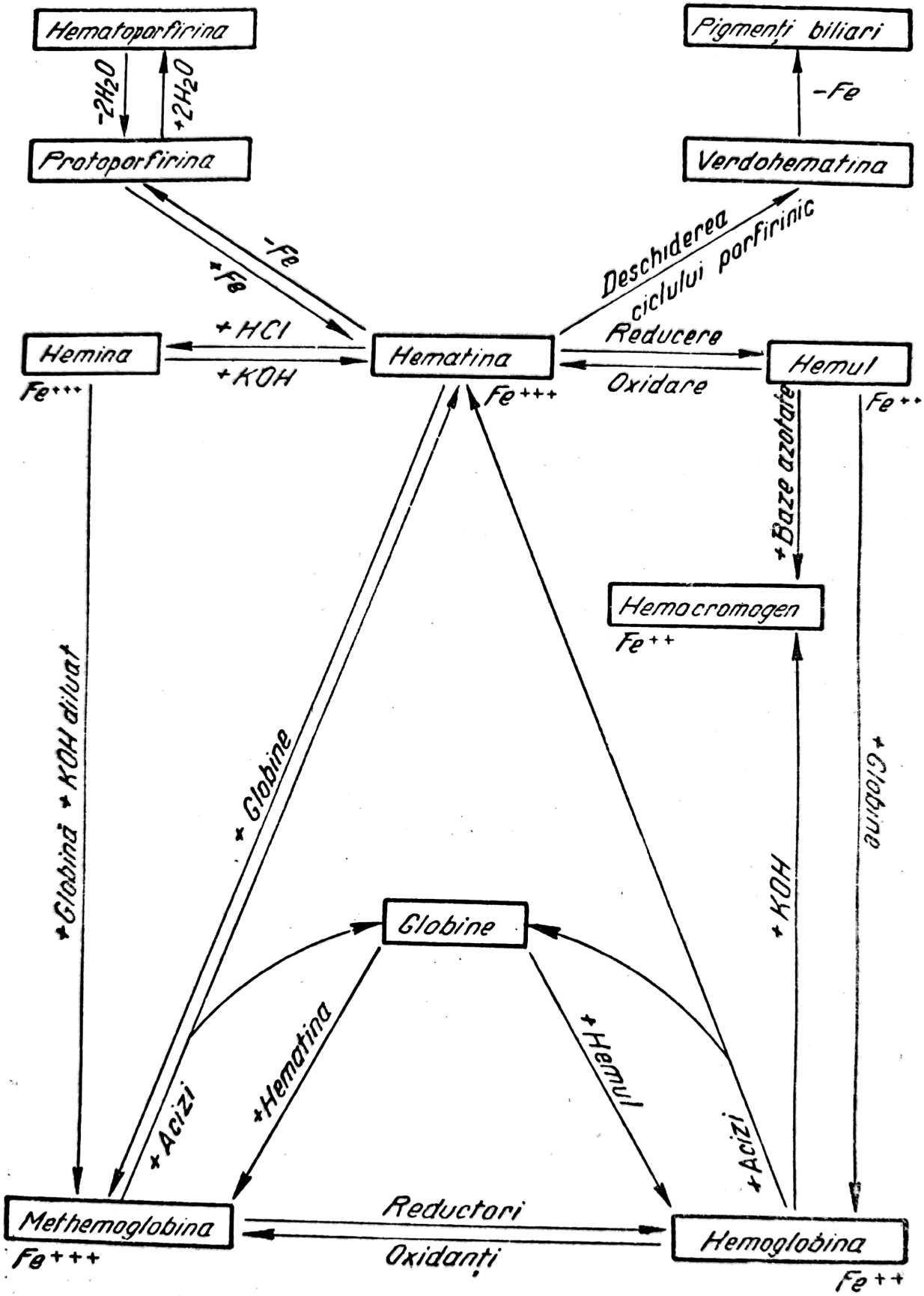


Fig. 26. Schema formării și degradării hemoglobinelor

Mioglobina din muşchi sau hemoglobina musculară are acelaş protohem ca şi hemoglobina sanguină, de care se deosebeşte însă prin componenta proteinică.

Cruorina, pigmentul feruginos respirator din sângele unui vierme mediteranean, *Spirografis,* are un hem înrudit cu al hemoglobinei, numai că în loc de grupări vinilice are la C_2 o grupare aldehidică : $-C\begin{matrix}\diagup O \\ \diagdown H\end{matrix}$.

Este interesant că *fermentul respirator* al lui Warburg cu rol important în oxidările celulare, citocromoxidaza, are o structură analoagă. Citocromii a, b, c şi citocromoxidaza se mai numesc şi hemine celulare.

b) *Componenta proteinică a hemoglobinei.* Componenta proteinică fixată la hemul hemoglobinei este o *globină.* Globinele diverselor hemoglobine sunt diferite între ele şi le conferă acestora caracterul lor organo-specific şi specio-specific (globina din sânge, globina din muşchi, a calului, a omului, etc.) Toate sunt caracterizate printr'un conţinut mare în histidină (8—10%). Se deosebesc între ele prin conţinutul în diverşi amino-acizi şi în special prin conţinutul în sulf. De exemplu, în hemoglobina de cal, la un atom de Fe există 2 S, la cea de câine 3, la cea de oaie 4. Globina musculară e diferită de aceea sanguină.

c) *Complexul hem-globină.* Constitue *hemoglobinele* când globina este nativă. Oricare ar fi origina hemului (protohemului), unirea cu una şi aceeaşi globină duce la una şi aceeaşi hemoglobină, corespunzătoare globinei şi nu hemului. Nu se ştie cu precizie cum se face legătura dintre globină şi hem. După unii, globina ar fi fixată la radicalul carboxilic al acidului propionic din molecula hemului; lucrările mai recente ar indica o fixare la atomul de Fe, formând un complex (o sare complexă) uşor hidrolizabil sub acţiunea acizilor sau a bazelor. Hemocromogenele care, am spus, conţin fie globina denaturată, fie baze azotate, fie alţi radicali, dau spectre de absorbţie foarte caracteristice, care au fost folosite pentru o mai bună cunoaştere a comportării chimice a hemului din hemoglobine. Formarea hemocromogenelor este utilizată pentru decelarea urmelor de sânge şi determinarea cantitativă a hemoglobinei.

Proprietăţile hemoglobinelor. Hemoglobinele sunt complecşi formaţi din globină şi o componentă ciclică, având o structură tetrapirolică şi Fe^{++}.

Se pot obţine sub forma cristalizată prin micşorarea solubilităţii lor în soluţie; de exemplu, dacă hemoglobina eliberată prin hemoliza globulelor roşii se precipită cu $SO(NH_4)_2$ sau cu un amestec în părţi egale de alcool-eter 1/10 la 0°. Cristalele obţinute diferă dela specie la specie şi permit identificarea originii hemoglobinei (cal, oaie, câine, porc, etc.).

Toate hemoglobinele conţin Fe în moleculă, aceea a mamiferelor 0,34%. Conţin S (0,40—0,96%).

Sunt substanţe cu greutate moleculară mare ~ 68 000; greutatea moleculară calculată pentru un singur atom de Fe pe moleculă este de 16 700; s'a dedus de aici că molecula întreagă a hemoglobinei are 4 atomi de Fe, deci 4 cicluri tetrapirolice. Mioglobina conţine un singur ciclu tetrapirolic; are greutate moleculară ~ 17 200.

Toate hemoglobinele se combină reversibil cu oxigenul. Oxigenul se fixează la atomul de Fe şi, după cercetătorul sovietic Astamin, procesul s'ar petrece astfel: oxigenul molecular disolvat în apă ar forma un acid

Scanned with OKEN Scanner

oximic, în care doi din oxigeni ar funcţiona ca tetravalenţi, aceştia s'ar fixa la atomul de fier, formând oxihemoglobina :

$$O_2 + H_2O \rightleftarrows H-\overset{OH}{\underset{|}{O}}=\overset{OH}{\underset{|}{O}}-H$$

acid oximic

$$H-\overset{OH}{\underset{|}{O}}=\overset{OH}{\underset{|}{O}}-H + Hb(OH) \rightleftarrows (Hb)O_2H_3 + H_2O$$

Fixarea oxigenului în molecula hemoglobinei se face cu uşurinţă, dar legătura este labilă. Hemul fixează oxigenul în mod reversibil şi fără modificare de valenţă a Fe^{++}, când e fixat de globină. Se formează oxi-

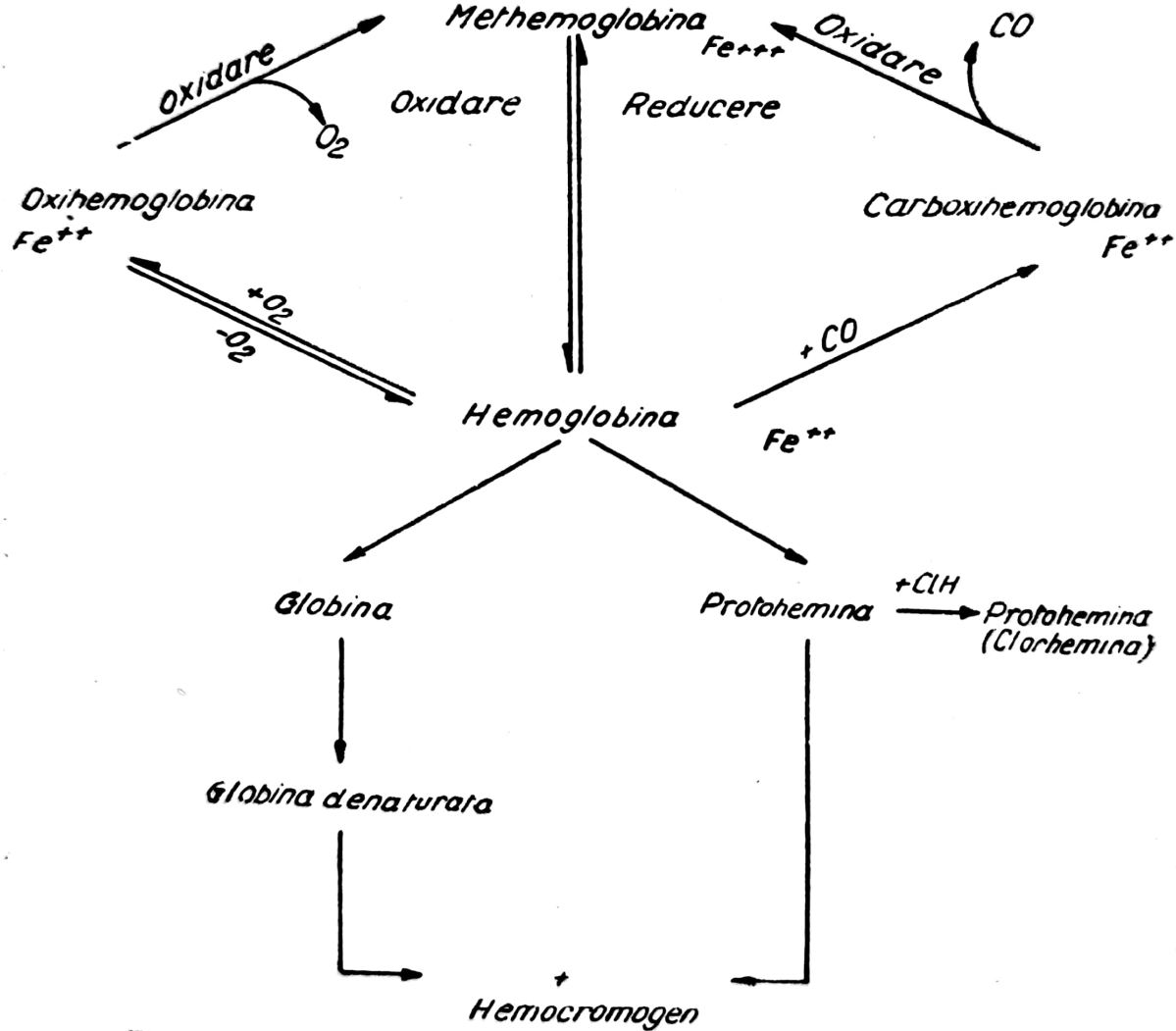


Fig. 27. Relaţiile dintre hemoglobină, methemoglobină, oxihemoglobină şi carboxihemoglobină.

hemoglobina, reacţia fiind reversibilă $Hb + O_2 \rightleftarrows HbO_2$. Hemoglobina $\rightleftarrows$ oxihemoglobina şi orientată spre oxihemoglobină cât timp este suficient oxigen în sistem ; altfel, reacţia este orientată în sensul formării de hemoglobină. Acestei proprietăţi i se datoreşte rolul de rezervor şi transportor de oxigen al hemoglobinelor. Deşi hemul e componenta care

Scanned with OKEN Scanner

fixează oxigenul, totuşi globina influenţează capacitatea sa de fixare; astfel, hemoglobinele sugarilor au o capacitate de fixare mai mare, deasemenea hemoglobina din muşchi are o capacitate de fixare mai mare decât cea din sânge. Hemul fixează oxigenul când presiunea parţială este mare şi îl eliberează când această presiune este mică. Se poate exprima grafic relaţia dintre procentul de oxigenare a hemoglobinei şi tensiunea oxigenului. Se obţine o curbă, aşa numita curbă de disociere a oxigenului. Dăm mai jos această curbă de disociere pentru valori diferite ale pH.

Cantitatea de oxigen fixată de o anumită cantitate de hemoglobină e în funcţie de presiunea parţială a oxigenului din sistem.

In condiţii favorabile, 1 g de hemoglobină se combină cu 1,36 cc oxigen. Afară de combinarea cu oxigenul, cu care formează oxihemoglobina, când Fe e bivalent, şi methemoglobina, când Fe e trivalent, hemoglobinele se mai pot uni şi cu alte gaze. Cu CO formează *carboxihemoglobina*, iar cu oxidul de azot, *nitricoxidhemoglobina*.

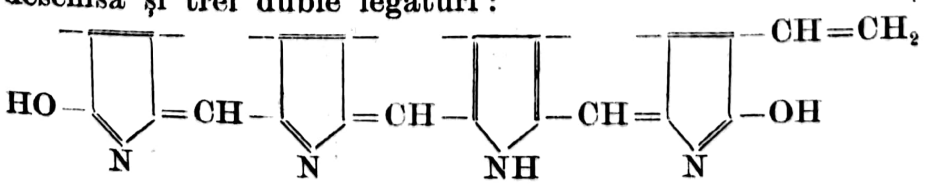
Methemoglobina este compusul în care Fe este trivalent şi fixează oxigenul la cea de a treia valenţă (sub formă de OH). Oxigenul fixat aici nu e disociabil, condiţia de a fixa oxigenul sub forma labilă, disociabilă (oxihemoglobina) fiind determinată de prezenţa Fe^{++} în moleculă şi de prezenţa globinei native. Methemoglobina e un pigment brun.

Carboxihemoglobina HbCO rezultă din combinarea oxidului de carbon cu hemul. E un compus disociabil, dar mai stabil decât cel cu oxigenul. Un atom gram de Fe^{++} se combină cu o moleculă gram de CO. Afinitatea pentru CO este de 300 de ori mai mare decât pentru oxigen, astfel că în amestec de CO şi O se face o fixare de CO la Hb, deci aceasta este sustrasă dela rolul ei de fixatoare a oxigenului, rol necesar arderilor celulare (aşa se explică nocivitatea oxidului de carbon, deşi ca atare CO nu este toxic). Aportul masiv de oxigen în aceste cazuri deplasează CO de pe hemoglobină. In molecula carboxihemoglobinei, fierul este Fe^{++}. Heminele şi hemocromogenele care conţin deci Fe^{+++} nu pot fixa CO, cum e cazul hemului (Fe^{++}). Hemoglobina, oxihemoglobina, heminele, hemocromogenele, methemoglobina au spectre de absorbţie diferite, ceeace permite o diferenţiere a lor pe cale spectroscopică (fig. 29).

Dăm un tabel care indică relaţia dintre diversele sisteme : hem, hemoglobină, oxihemoglobină, hematină, methemoglobină, etc. (vezi fig. 27).

Origina hemoglobinei în organism nu este bine cunoscută. Hemoglobina este sintetizată din componentele sale aflate în alimente, fier şi derivaţi pirolici. Mecanismul nu este însă bine cunoscut. Se crede că acidul folic (din grupa vitaminelor B) ar avea rol în hematopoeză.

Soarta hemoglobinei în organism este însă mai bine cunoscută. Ea este degradată în o serie de compuşi coloraţi, cunoscuţi sub numele de *pigmenţi biliari*. Prin ruperea ciclului tetrapirolic la nivelul grupelor metenice se obţin compuşi care pierd cu uşurinţă fierul şi componenta proteinică; rezultă ca prim compus *biliverdina*, de coloraţie verde, compus cu catenă deschisă şi trei duble legături :



biliverdina

Scanned with OKEN Scanner

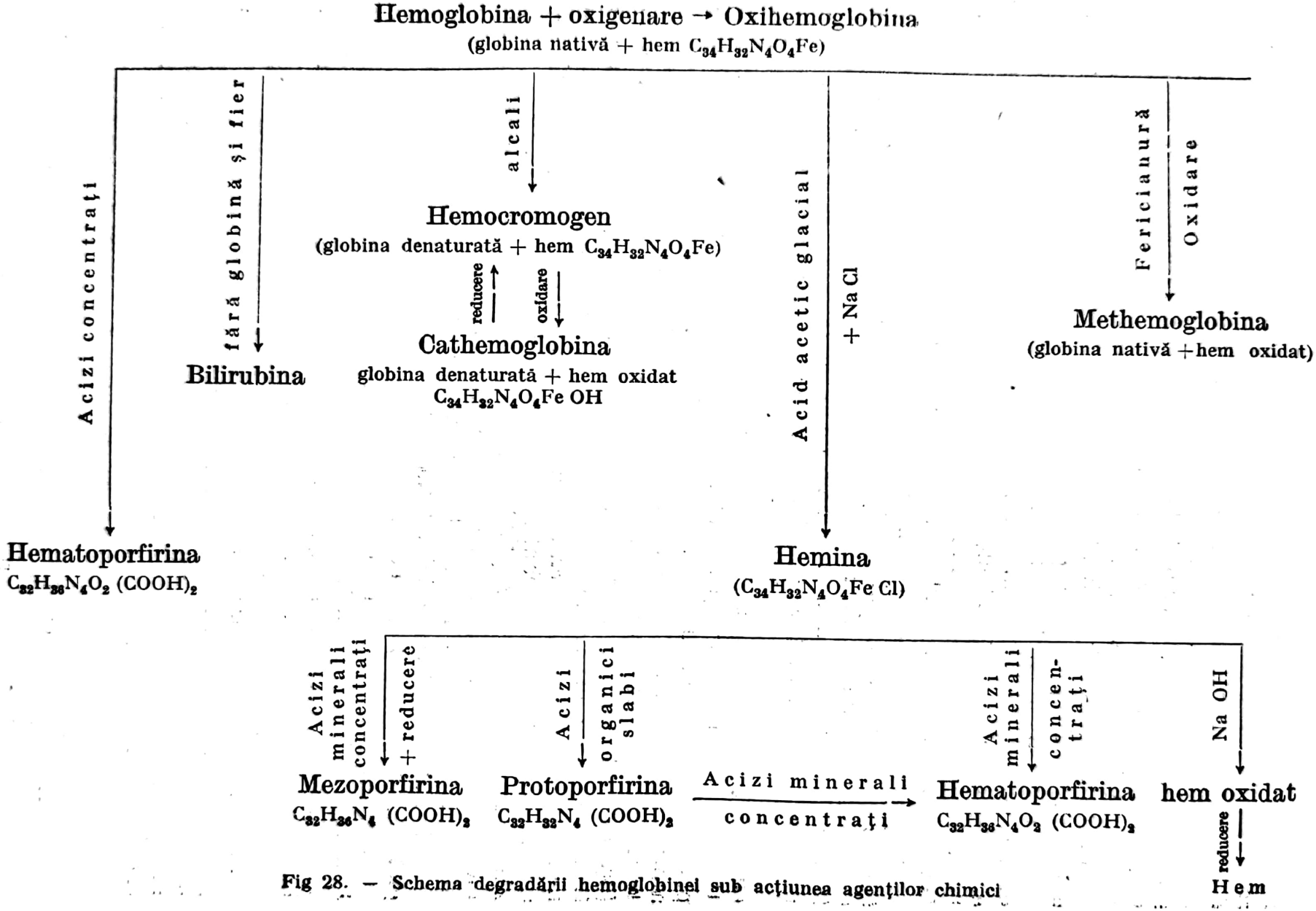
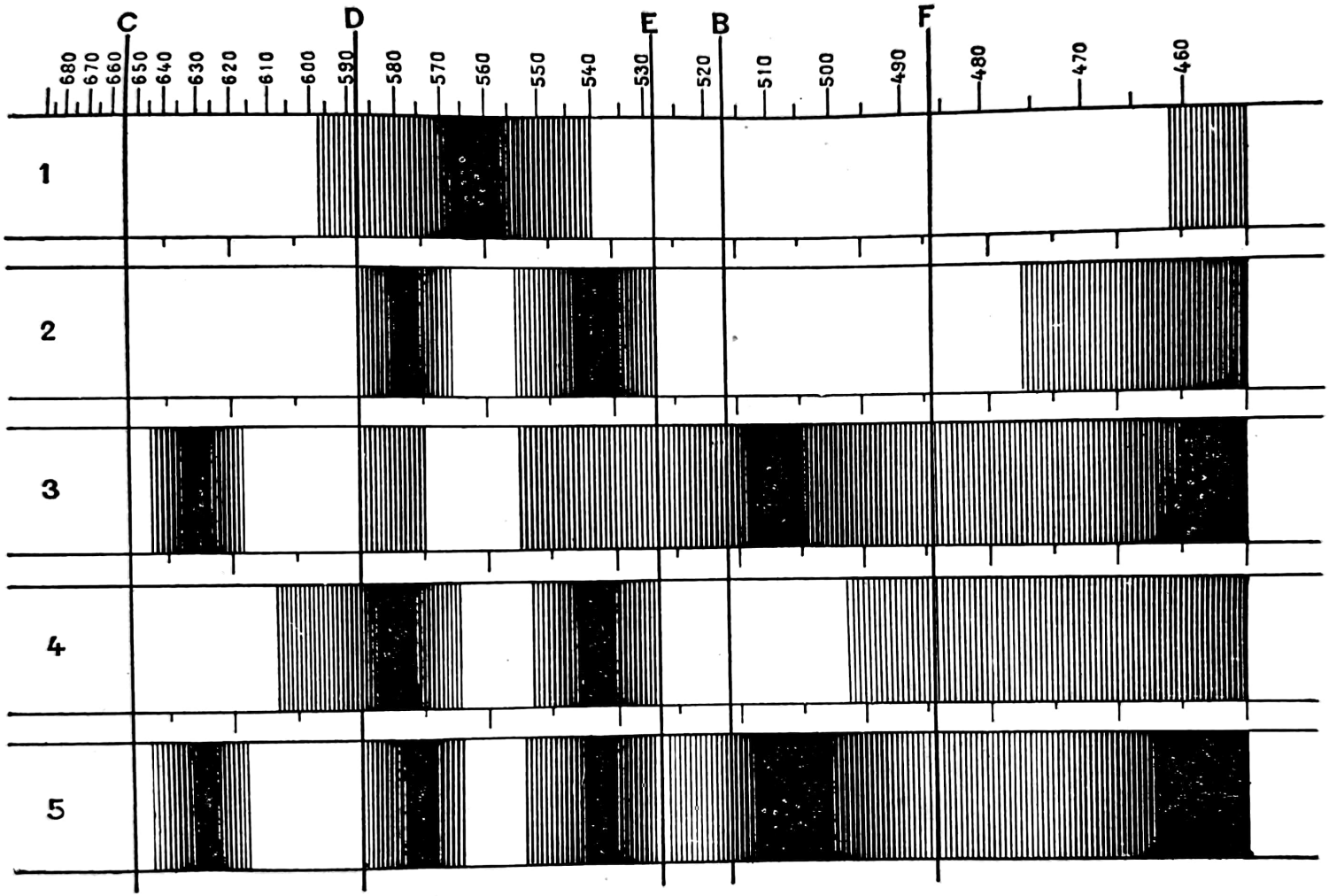


Fig 28. — Schema degradării hemoglobinei sub acțiunea agenților chimici

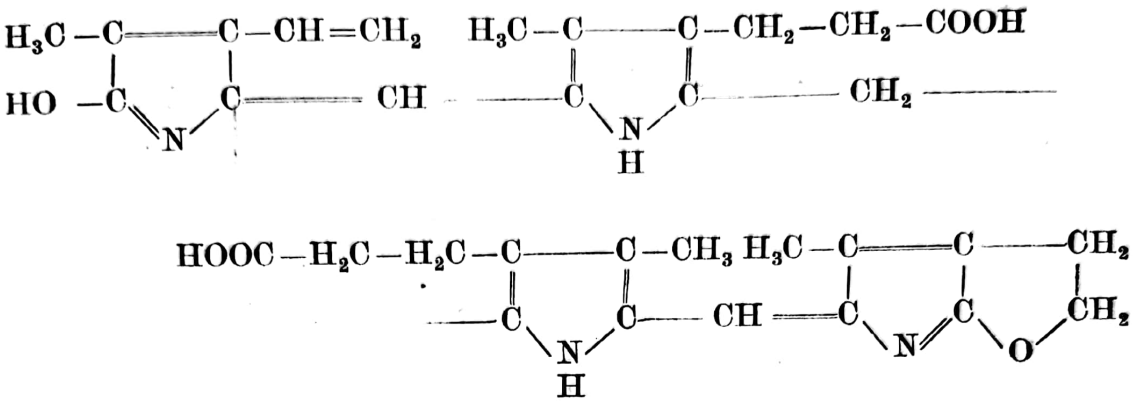


1 — Hemoglobină redusă
2 — Oxihemoglobină
3 — Methemoglobina în sol. acidă
4 — Methemoglobina în sol. alcalină
5 — Amestec de methemoglobină și oxihemoglobină

Fig. 29. — Spectrele hemoglobinei

Scanned with OKEN Scanner

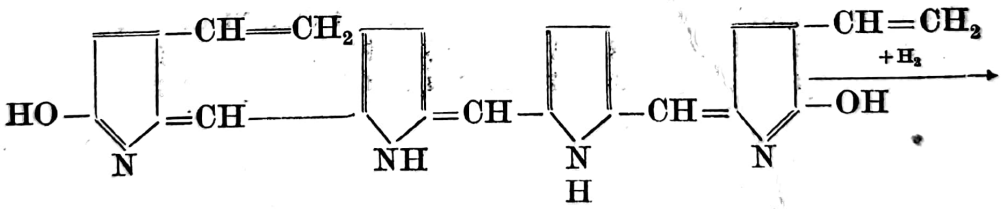
Acesta, prin fixare de H_2 la una din legăturile duble, se transformă în *bilirubină*, care are numai două legături duble şi e colorată în roşu :



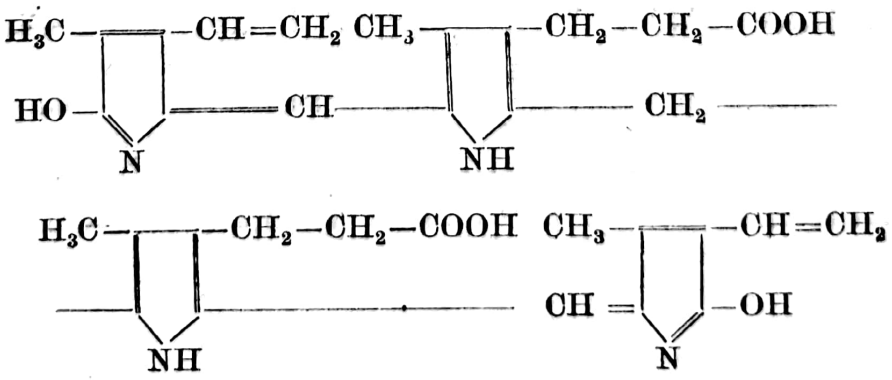
bilirubina

Bilirubina şi biliverdina constitue pigmenţii biliari. Schematic, transformările care au loc sunt : hemoglobină → biliverdină → bilirubină. Locul de formare a bilirubinei este probabil ficatul ; se crede că ţesutu reticulo-endotelial ar realiza primele etape ale acestei transformări, ţesutul hepatic le-ar continua, iar transformările ulterioare ale pigmenţilor biliari se fac sub intervenţia bacteriilor intestinale, cu formare de *mezobilirubinogen, stercobilinogen* şi apoi *stercobilina*, care este principalul pigment al fecalelor normale.

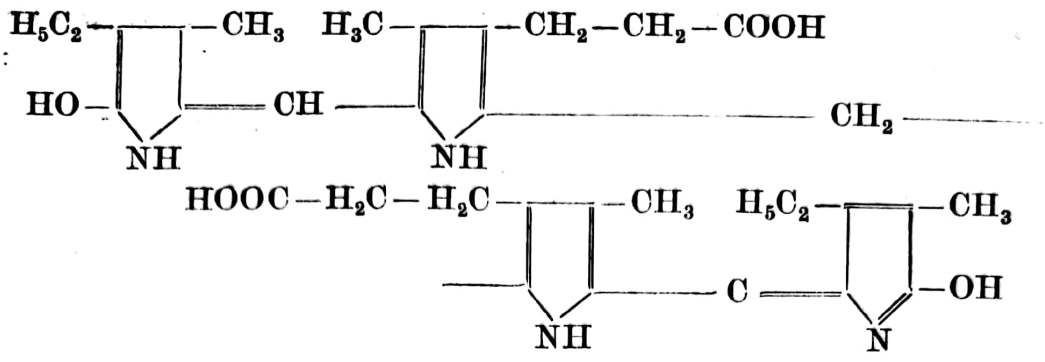
Aceşti compuşi rezultă prin hidrogenarea grupărilor vinilice — CH = = CH_2 din molecula bilirubinei şi transformarea lor în grupări etilice — — CH_2 — CH_3.



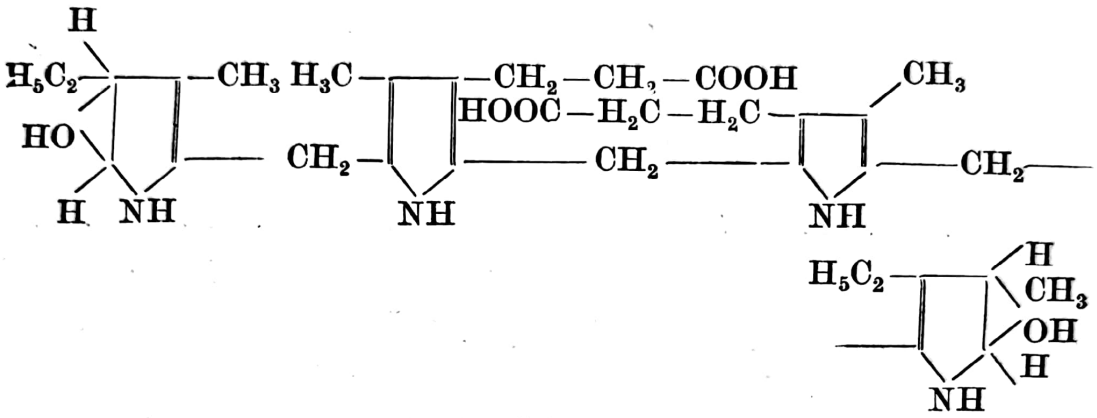
biliverdină



bilirubină



mezobilirubină

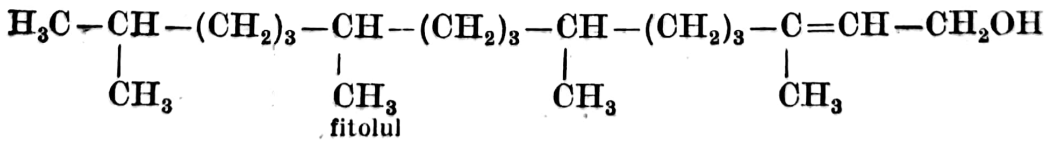


stercobilină (urobilină)

O parte din stercobilinogen şi stercobilină se elimină şi prin urină, unde poartă numele de urobilinogen şi urobilină. O degradare anormală a hemoglobinei duce la un compus numit *pentdiopent,* numit astfel pentrucă prezintă maximul de absorbţie în lungimea de undă de 525 mμ. Este un produs de oxidare foarte avansată a Hb; nu conţine Fe şi nici globină. Se găseşte în sânge şi urină numai în cazul unei leziuni hepatice. Se obţine din hemoglobină sub acţiunea apei oxigenate (rolul catalazei este tocmai de a împiedica această transformare prin acţiunea pe care o are asupra H_2O_2).

Clorofila

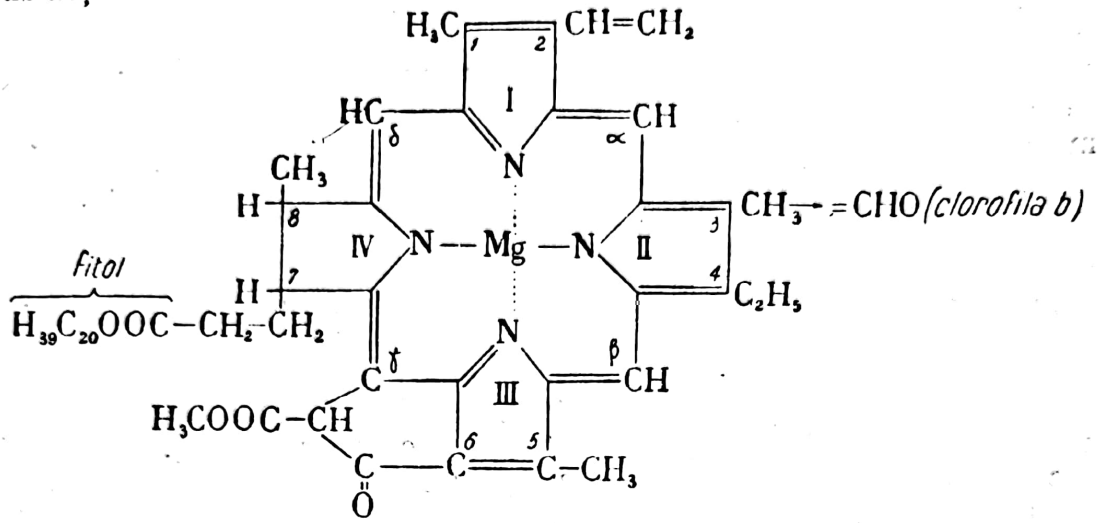
Pigmentul colorat al frunzelor verzi are o structură extrem de apropiată de aceea a grupării prostetice a hemoglobinelor. Conţine însă ca metal Mg în loc de Fe. Se cunosc două clorofile, *a* şi *b,* care au fost izolate prima oară de savantul rus Ţvet cu ajutorul metodei cromatografice. Din unirea clorofilei cu o proteină rezultă cromoproteida, care se găseşte în cloroplastele vegetalelor, numită şi *cloroplastină.* Moleculele celor două clorofile conţin nucleul tetrapirolic ca şi în hem şi două grupuri acide, din care unul este esterificat cu un alcool superior nesaturat, fitolul:



fitolul

($C_{20}H_3OH$) iar celălalt cu alcoolul metilic. Clorofila *b* conţine în plus faţă de clorofila *a,* o grupare aldehidică în locul celei metilice.

La plante clorofila este în mod constant întovărăşită de o enzimă, *clorofilaza*, sub acţiunea căreia fitolul este scindat, rămânând o serie de pigmenţi



Clorofila a

colorați numiți *clorofide*. După ingerare de clorofilă se elimină în urină produse de degradare a acestora, porfirine caracteristice.

Partea II-a

GLUCIDELE

Importanța biologică a glucidelor este fundamentală în dinamismul vieții. Glucidele au în organism în special rol energetic şi în mult mai mică măsură rol plastic. Sunt compuşi ternari, conţin *C*, *H* şi *O*. In nomenclatura mai veche aveau şi denumirea de „hidraţi de carbon", deoarece proporţia în care se găsesc H şi O în majoritatea acestor compuşi este aceeaşi ca în molecula apei, şi anume *2H la un O* (2 :1). Denumirea s'a dovedit improprie, deoarece există compuşi care au H şi O în aceeaşi proporţie şi nu sunt totuşi glucide, ca de exemplu acidul acetic $C_2H_4O_2$ sau acidul lactic $C_3H_6O_3$, iar pe de altă parte sunt glucide adevărate, ca ramnoza, care nu conţin H şi O în această proporţie ($C_6H_{12}O_5$). Din aceste motive, Comisia internaţională pentru nomenclatura chimică a adoptat denumirea de *glucide* pentru această clasă de compuşi; denumirea este dată după primul compus de importanţă fundamentală al grupei, glucoza.

Structura chimică a glucidelor. Glucidele conţin în moleculă C, H şi O.

Din punctul de vedere al funcţiei chimice sunt *oxialdehide* sau *oxicetone*; conţin deci în moleculă funcţia *alcool primar* $-CH_2OH$ sau *alcool secundar* CHOH şi *funcţia aldehidă* $-C\begin{matrix}O\\H\end{matrix}$ sau *cetonică* $>C=O$.

Sunt deci aldehide sau cetone ale alcoolilor polivalenţi. Glucidele care conţin gruparea aldehidică $\begin{matrix}R\\H\end{matrix}>C=O$ se numesc şi *aldoze*. Cele cu o grupare cetonică se numesc *cetoze* $\begin{matrix}R\\R\end{matrix}>C=O$.

Clasificarea glucidelor. Glucidele se împart în două clase mari : I. oze şi II. ozide. Clasificarea aceasta este stabilită pe baza posibilităţilor lor de a se hidroliza.

I. *Ozele* sunt zaharurile simple care nu pot fi hidrolizate. Se numesc şi *monozaharide,* deoarece nu sunt hidrolizabile la molecule mai mici.

După numărul carbonilor din moleculă, ozele pot fi clasificate în trioze, tetroze, pentoze, hexoze, etc.

II. *Ozidele* sunt zaharurile hidrolizabile sub acţiunea acizilor sau a enzimelor; ele pot fi descompuse în zaharuri mai simple — în oze (monozaharide).

Ozidele se subdivid în două grupe: holozide şi heterozide.

A. *Holozidele* sunt formate exclusiv din oze (monozaharide) şi după numărul monozaharidelor pe care le conţin se împart în oligozaharide şi polizaharide.

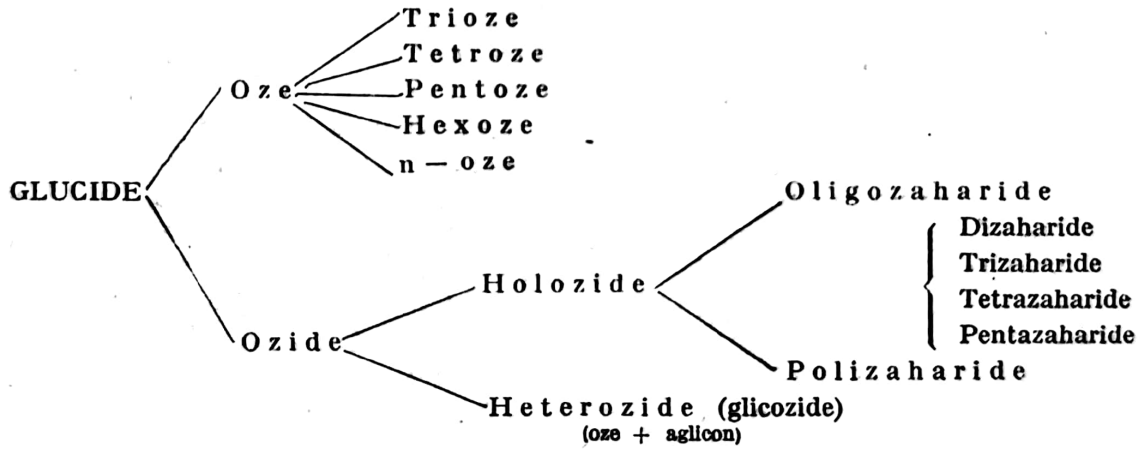
a) Oligozaharidele cuprind un număr mic de monozaharide identice sau diferite între ele, dar numărul lor în moleculă e cunoscut.

b) Polizaharidele au în moleculă un număr mare de monozaharide, număr care nu poate fi precizat. Aceste monozaharide sunt legate între ele constituind o moleculă foarte mare, o *macromoleculă.* Polizaharidele fac parte astfel din grupa compuşilor cu moleculă foarte mare, aşa zisă a *polimerilor înalţi.*

Holozidele rezultă din oze prin eliminarea unei molecule de apă la punctele de legătură. Legătura între oze se face astfel prin intermediul unui atom de oxigen.

B. *Heterozidele* sunt formate din oze şi o componentă neglucidică denumită „aglicon". Heterozidele se mai numesc şi „glicozide" sau

Clasificarea glucidelor

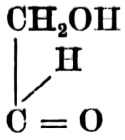


„glucozide". Heterozidele se descompun în componentele lor prin hidroliză acidă sau enzimatică.

I. OZELE SAU MONOZAHARIDELE

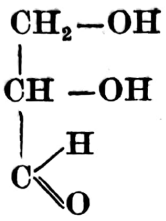
Ozele sunt, din punctul de vedere al funcţiei lor chimice, alcool-aldehide sau alcool-cetone. Sunt produse de oxidare ale polialcoolilor, în care o grupare alcool primar este transformată în funcţie aldehidă în cazul aldozelor, iar o grupare alcool secundar este transformată în funcţie cetonică în cazul cetozelor. Sunt deci *aldoze* sau *cetoze.* După numărul carbonilor din moleculă, ozele pot fi dioze ($C_2H_4O_2$), trioze ($C_3H_6O_3$), tetroze ($C_4H_8O_4$), pentoze ($C_5H_{10}O_5$), hexoze ($C_6H_{12}O_6$), etc. In natură nu se găsesc decât oze cu 5 şi 6 carboni. Sintetic s'a reuşit prepararea ozelor cu 2, 3 şi 4 carboni, precum şi cu 7 şi 10 carboni.

Cel mai simplu monozaharid este *glicoaldehida sau glicoloza* cu 2 atomi de carbon în moleculă :

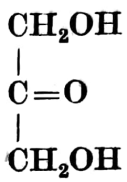


glicoaldehida
(glicoloza)

Cu 3 atomi de carbon în moleculă sunt triozele derivate din glicerol, anume *glicerinaldehida* sau aldotrioza şi dioxiacetona :

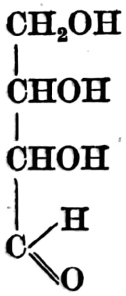


glicerinaldehida
(aldotrioza)

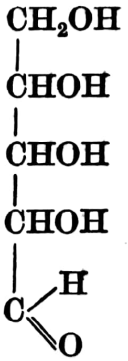


dioxiacetona

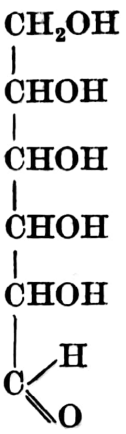
Cu 4 atomi de carbon, *tetrozele* (eritroza şi treoza) nu au fost găsite în produsele naturale. Răspândite în natură sunt *pentozele* cu 5 atomi de carbon în moleculă (arabinoza, xiloza, lixoza, riboza, ramnoza, desoxiriboza) şi *hexozele,* cu 6 atomi de carbon în moleculă (glucoza, fructoza, galactoza, manoza). Vom reveni în detaliu asupra compuşilor mai importanţi.



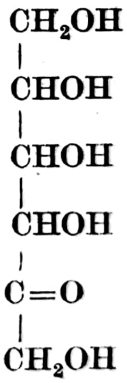
aldotetroză



aldopentoză



aldohexoză



cetohexoză

PROPRIETĂŢILE GENERALE ALE MONOZAHARIDELOR

Proprietăţi fizice

1. Sunt uşor solubile în apă, datorită grupărilor oxidrilice multiple, iar prin concentrare soluţiile lor devin siropoase.
2. Sunt greu solubile în alcool, insolubile în eter, cloroform.
3. Sunt cristalizabile.
4. Au gust dulce. Gustul mai mult sau mai puţin dulce e determinat de gradul de solubilitate. Fructoza, cea mai solubilă, are şi gustul cel

mai dulce. Mierea de albine conține multă fructoză. Gustul variază astfel cu fiecare monozaharid. El mai depinde de altfel și de mărimea cristalelor.

5. Au putere rotatorie datorită prezenței C asimetric din moleculă (C asimetric se notează cu o mică steluță) (se înțelege sub C asimetric acel carbon care are fixate la cele 4 valențe atomi sau radicali diferiți între ei). Prezența C asimetric determină asimetria întregii molecule, iar datorită acestei asimetrii moleculare, ozele deviază planul luminii polarizate (sunt deci ceeace se numește substanțe optic active).

Undele luminii obișnuite vibrează în toate planurile perpendicular pe direcția de propagare. În anumite condiții, lumina poate fi obligată să vibreze într'un singur plan și în acest caz este ceeace se numește „polarizată". Astfel, dacă o rază este lăsată să treacă printr'un cristal de calcită (carbonat de calciu natural, cristalizat) este desfăcută în două raze, fiecare din ele polarizată și vibrând pe planuri perpendiculare unul pe celălalt (fig. 30). Dacă cele două raze sunt inegal deviate, ele se pot separa și se obține astfel vibrația luminii într'un singur plan. Pentru a le separa, se folosesc așa numiți *nicoli*, o prismă formată din două piese de calcită lipite între ele cu balsam de Canada. Raza de lumină, trecând prin prismă, este deviată în două raze: o rază ordinară *O* este reflectată de balsamul de Canada în exterior și absorbită de o pătură neagră care îmbracă prisma.

Cealaltă rază extraordinară, *e*, trece prin balsam și iese din prismă sub forma de lumină polarizată (fig. 30). O serie de substanțe și în special zaharurile au proprietatea de a roti acest plan al luminii polarizate, iar extensia rotației este în funcție de natura și numărul moleculelor prin care trece lumina polarizată.

Dacă se reprezintă în spațiu atomul de carbon asimetric se constată că prezența sa într'o moleculă poate duce la diverse tipuri ale uneia și aceleiași molecule, tipuri care să difere între ele numai prin orânduirea diferită a atomilor sau radicalilor din jurul carbonului asimetric. Aceste tipuri ale uneia și aceleiași molecule sunt izomere între ele și se deosebesc numai prin proprietățile lor optice. Prezența în moleculă a unui singur atom de C asimetric face posibilă existența a trei izomeri optici, unul care deviază planul de polarizare la dreapta, altul la stânga, iar al treilea inactiv din punct de vedere optic, forma așa numită racemică, rezultată din amestecul celor doi izomeri optic activi. Numărul carbonilor asimetrici din moleculă determină numărul izomerilor optic activi. Dacă se notează cu n numărul atomilor de C asimetrici din moleculă, numărul izomerilor optic activi va fi 2^n (pentru un singur C numărul izomerilor optic activi este deci egal cu 2).

Demonstrația activității optice se face cu polarimetrul. *Rotația specifică* a unei substanțe este rotația exprimată în grade a unui gram de substanță dizolvată în 1 l apă, determinarea fiind făcută într'un tub de 1 dm lungime (v. tabelul 4).

Se notează cu $[\alpha]^D$ și se poate calcula cu formula

$$[\alpha]_D = \frac{\alpha}{g \cdot l}$$

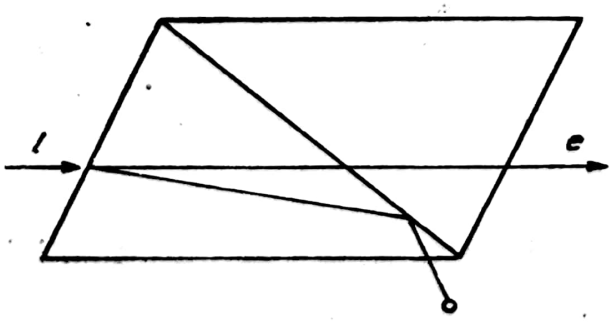


Fig. 30. Trecerea luminii printr'o prismă Nicol

unde

D = lumina de sodiu,
α = rotația observată în grade,
g = grame substanță disolvată în 1 cc lichid
l = lungimea tubului în decimetri

Dacă s'a determinat rotația specifică, se poate calcula cantitatea în grame de substanță din soluție cu formula:

$$g = \frac{\alpha}{[\alpha]_D l}$$

Valoarea g multiplicată cu 100 dă procentul substanței din soluție.

Soluţiile de zaharuri (glucoza, levuloza, lactoza, maltoza) proaspăt preparate îşi modifică puterea rotatorie (mutarotaţie). Se recomandă din acest motiv ca determinările polarimetrice să fie făcute pe soluţii lăsate peste noapte, încălzite la 100° şi apoi răcite. In acest fel se realizează echilibrul între formele izomere optic active (α şi β) din sistem.

Rotaţia specifică a glucidelor mai importante în concentraţie de 10% şi la temperatura de 20°

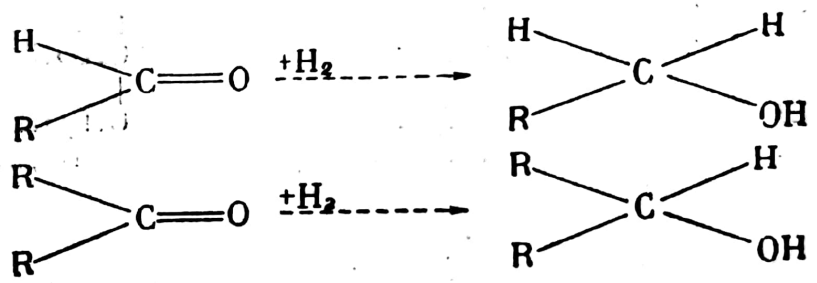
Tabelul Nr. 4

d-Glucoza	+ 52°5	Zaharoza	+ 66°5
d-Fructoza	− 92°3	Lactoza	+ 52°5
d-Galactoza	+ 81°5	Maltoza	+137°0
d-Manoza	+ 14°2	Rafinoza	+104°0
l-Arabinoza	+ 104°5	Dextrina	+195°0
d-Xiloza	+ 19°0	Amidon	+196°0
Ramnoza	+ 9°0	Glicogen	+197°0

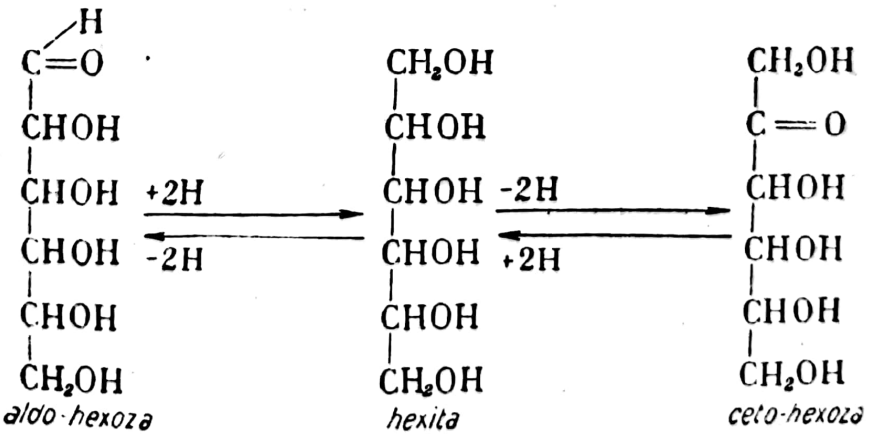
Proprietăţile chimice

A. Acţiunea agenţilor reducători

Prin reducere, adică prin fixare de hidrogen, monozaharidele pot fi transformate în alcooli corespunzători. Fixarea hidrogenului se face la gruparea aldehidică respectiv cetonică din moleculă şi duce la transformarea acesteia în grupare alcoolică.



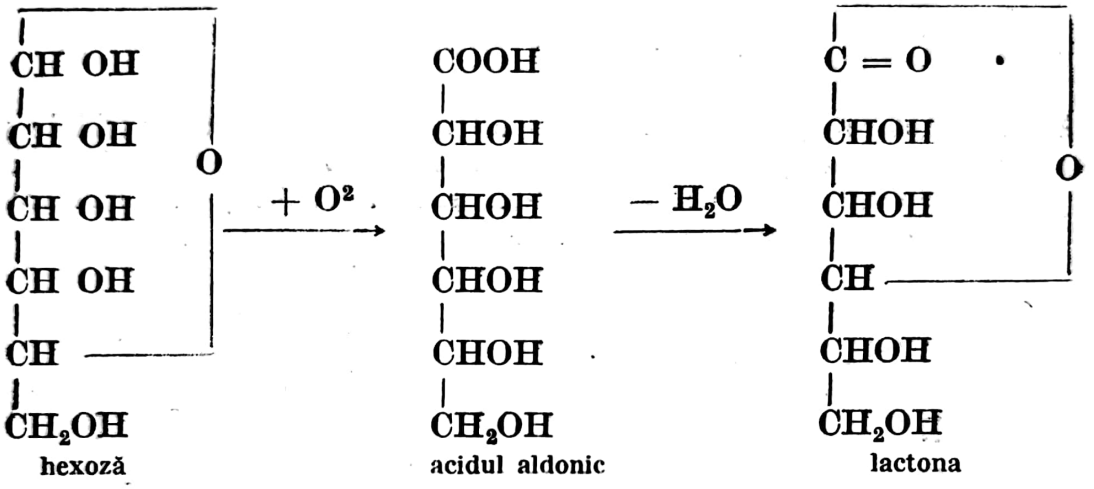
Aldozele şi cetozele se comportă la fel faţă de agenţii reducători (ca de exemplu amalgamul de sodiu, de aluminiu, hidrogenul). Se obţin astfel din aldoze şi cetoze alcoolii corespunzători, polialcooli foarte răspândiţi în natură. Tetrozele se transformă în tetrite, pentozele în pentite, hexozele în hexite, etc :



B. Acțiunea agenților oxidanți

După intensitatea acțiunii de oxidare și după cum avem de a face cu aldoze sau cetoze, produsele rezultate din monozaharide vor fi diferite.

1. Aldozele prin *oxidare slabă* se transformă în *oxiacizii monobazici* corespunzători (cu același număr de atomi de carbon) prin transformarea grupării carbonilice în grupare acidă (adică gruparea C=O, în COOH). Se obțin oxiacizi conținând o grupare carboxilică și grupări alcoolice și care pot exista sub două forme : *forma aldonică* și *forma lactonică* (δ sau γ).



hexoză — acidul aldonic — lactona

2. Aldozele, prin *oxidare puternică* (acid azotic concentrat la cald), sunt transformate în *oxiacizii bihazici* corespunzători.

Oxidarea are loc atât la gruparea carbonilică, cât și la gruparea alcoolică terminală din moleculă. Se obțin așa numiții *„acizi zaharici"*, caracterizați prin prezența în moleculă a două grupări carboxilice terminale. Au formula generală : $HOOC - (CHOH)_n - COOH$.

Acidul zaharic corespunzător glucozei are numele de acid *d-zaharic*, acidul zaharic corespunzător galactozei are numele de *acid mucic*, acela corespunzător *d*-manozei de *acid d-manozaharic*.

Prin reducerea acizilor zaharici se obțin ozele dela care s'a pornit, iar prin reducerea incomplectă a uneia din grupările carboxilice terminale și transformarea ei în grupare aldehidică se obțin *acizi-aldehide*, compuși importanți din punct de vedere fiziologic, așa numiții *acizi uronici* ; aceștia au la una din grupările terminale o funcție acidă, la cealaltă o funcție aldehidă.

Acidul uronic corespunzător glucozei este acidul *d-glicuronic*, care se găsește în mod normal în sânge, în mici cantități în urină sub formă de combinații cu fenoli, cresoli, constituind așa numiții compuși „glicurono-conjugați", compuși cuplați care permit eliminarea produselor toxice de tipul fenolilor prin cuplare cu acizii uronici.

Vom vedea că realizarea compușilor conjugați de acest tip este o cale de apărare a organismului, eliminând substanțele toxice.

Scanned with OKEN Scanner

C. Acțiunea alcalilor

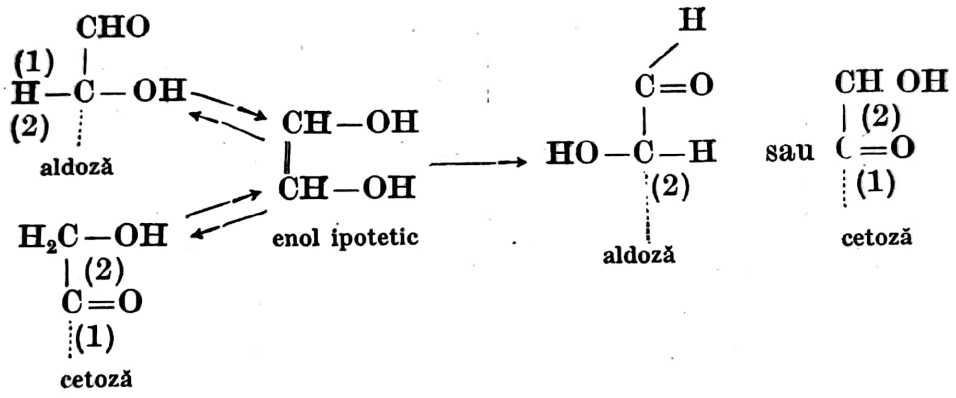
E diferită după cum avem de a face cu alcali puternici sau slabi.

Alcalii puternici scindează molecula ozelor în molecule mai mici, de exemplu transformă glucoza (cu 6 carboni) în acid lactic (cu 3 carboni).

Alcalii slabi, la rece, produc o transformare sterică, o *izomerizare* la carbonul (2) vecin grupării carbonilice.

Izomerizarea se face printr'o transpoziție între gruparea carbonilică și gruparea alcoolică vecină, constând dintr'o rotație de 180° a hidrogenului sau oxidrilului dela carbonul 2, în jurul axei moleculei. Această transpoziție poartă numele de *epimerizare* (transpoziție Lobry De Bruin Van Eckstein).

Transpoziția s'ar face prin realizarea intermediară a unui *enol ipotetic*, conform formulelor :



Cei doi izomeri epimeri nu se deosebesc între ei decât prin poziția oxidrilului sau a H dela carbonul (2).

Monozaharidele care se deosebesc între ele prin poziția oxidrilului sau a hidrogenului dela carbonul (2) sunt *epimere între ele* ; astfel, d-manoza, d-glucoza și d-fructoza sunt epimere între ele. Intr'adevăr, dacă se adaugă unor soluții pure de glucoză sau manoză sau fructoză un alcal slab, se constată după un anumit interval, în fiecare din aceste soluții *inițial pure*, prezența tuturor celorlalte zaharuri în anumite proporții, anume un amestec format din :

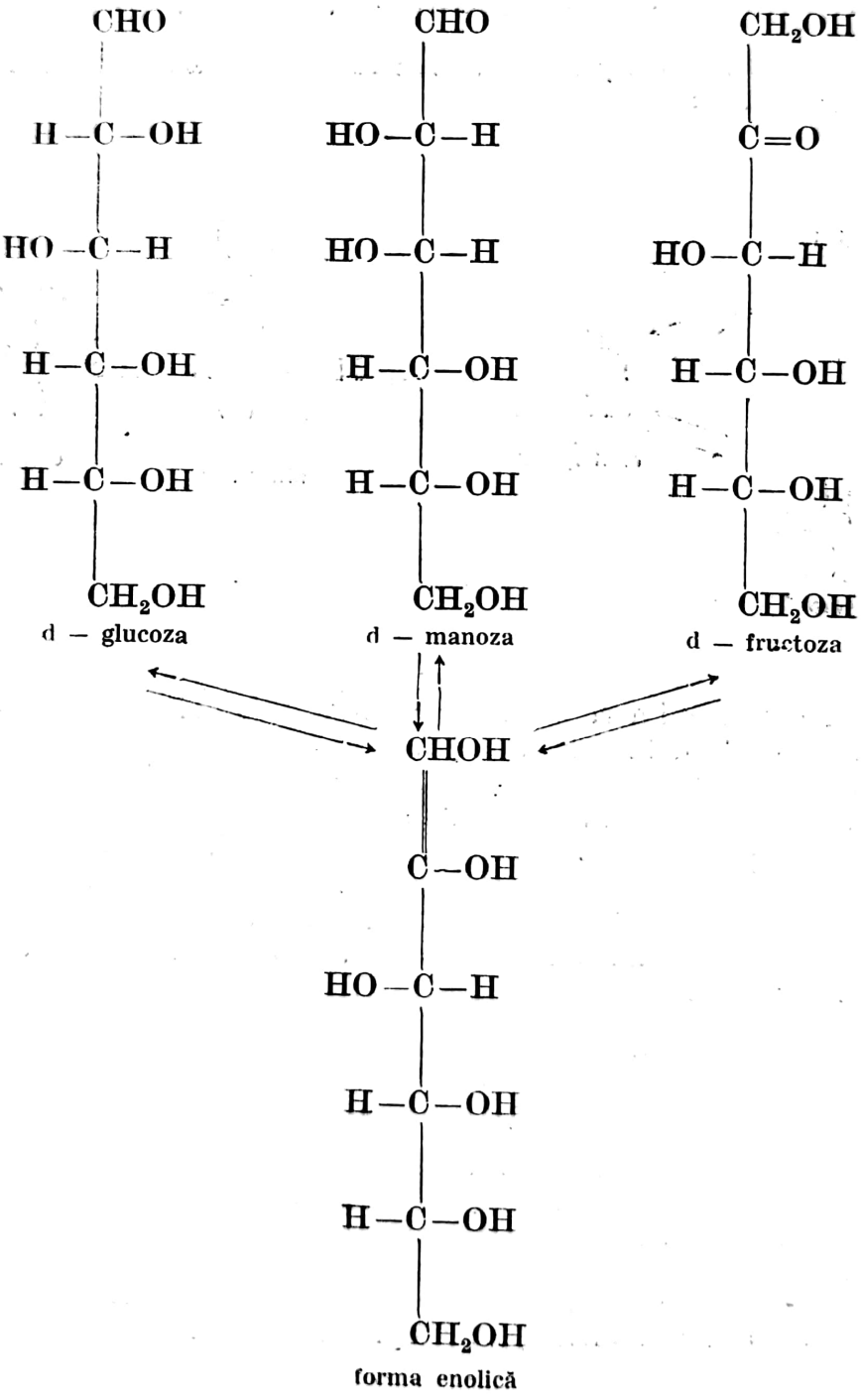
63,5 % d-glucoză,
2,5 % d-manoză
31 % d-fructoză.

Sub acțiunea alcalilor slabi a avut deci loc o transpoziție, o epimerizare care duce la cele trei tipuri de zaharuri izomere pornind dela un singur tip pur. Final s'a ajuns la același amestec în echilibru, indiferent de zaharul de plecare, lucru care poate fi explicat prin realizarea intermediară a unuia și aceluiași compus enolic, care poate trece cu ușurință în fiecare din cele trei monozaharide epimere ce se regăsesc în amestecul final.

Exemplu :

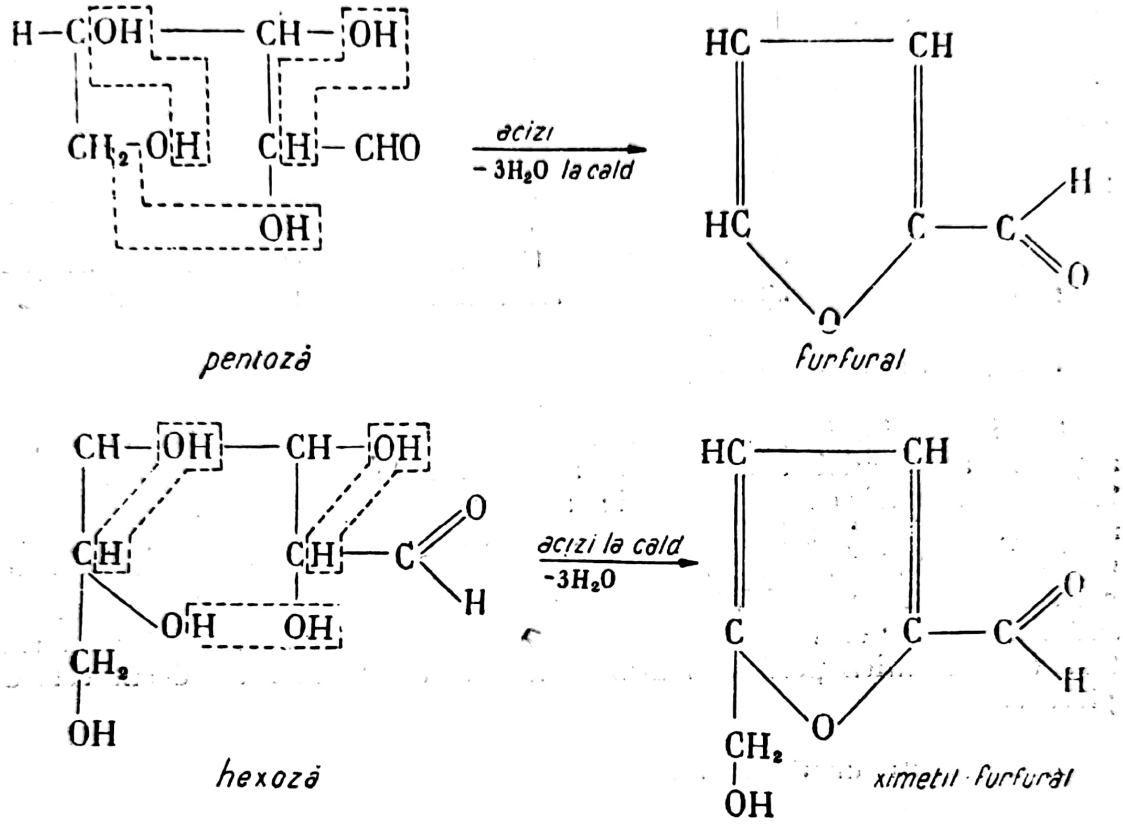
d – glucoza
d – manoza
d – fructoza
→ forma enolică →
d – glucoza
d – manoza
d – fructoza

d – glucoza
alcali diluaţi →
63,5 % d – glucoza
2,5 % d – manoza
31 % d – fructoza



D. Acţiunea acizilor.

Acizii puternici transformă *pentozele* în *furfural*, *hexozele* în *oximetil-furfural* şi apoi în *acid levulic* conform reacţiei :

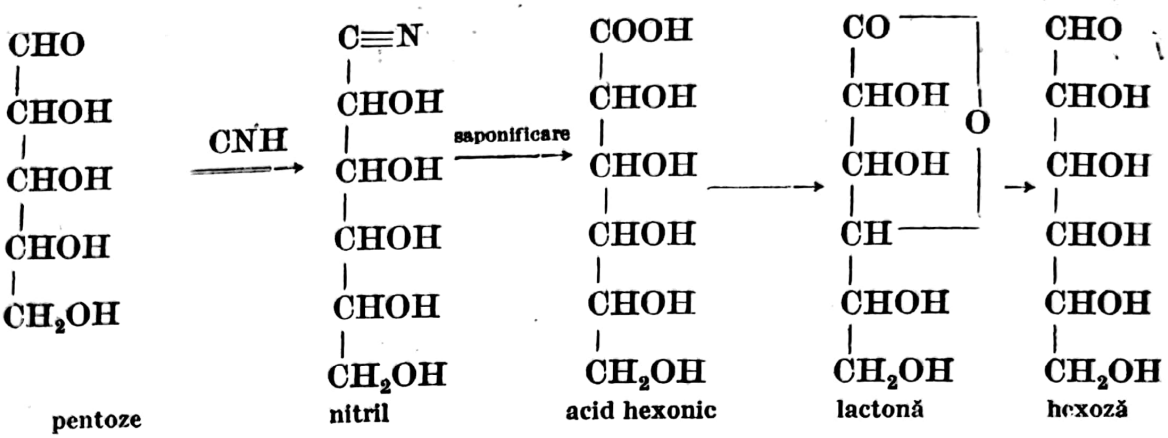


Furfuralul eliberat din pentoze se poate combina cu uşurinţă cu anumiţi compuşi ca *fluoroglucina* sau *orcina*, dând produse colorate care pot servi la identificarea pentozelor şi diferenţierea lor de hexoze (reacţia Tollens); cu *rezorcina* dau compuşi care permit diferenţierea şi identificarea cetozelor (fructoza) (reacţia Selivanov). Zaharurile, datorită funcţiilor oxidrilice pe care le conţin, pot forma cu acizii minerali esteri, unii din aceştia, ca de exemplu aceia formaţi cu acidul fosforic, având o mare importanţă în metabolismul glucidelor.

E. Acţiunea acidului cianhidric (CNH)

Acţiunea acidului cianhidric asupra ozelor duce la formare de *nitril-alcooli*, compuşi care pot fi hidrolizaţi, rezultând un nou monozaharid ce conţine un C mai mult decât monozaharidul de plecare. Cu ajutorul acestei reacţii se pot deci sintetiza oze cu un număr mai mare de atomi de carbon; ea constitue aşa numita *sinteză cianhidrică* (sinteza Kiliani). Se formează mai întâi acidul cu un carbon mai mult decât oza de plecare şi acesta prin reducere dă naştere unei oze cu un C mai mult decât aceea de plecare. Cu ajutorul acestei metode s'a reuşit în laborator sinteza unei oze cu 9 atomi de carbon.

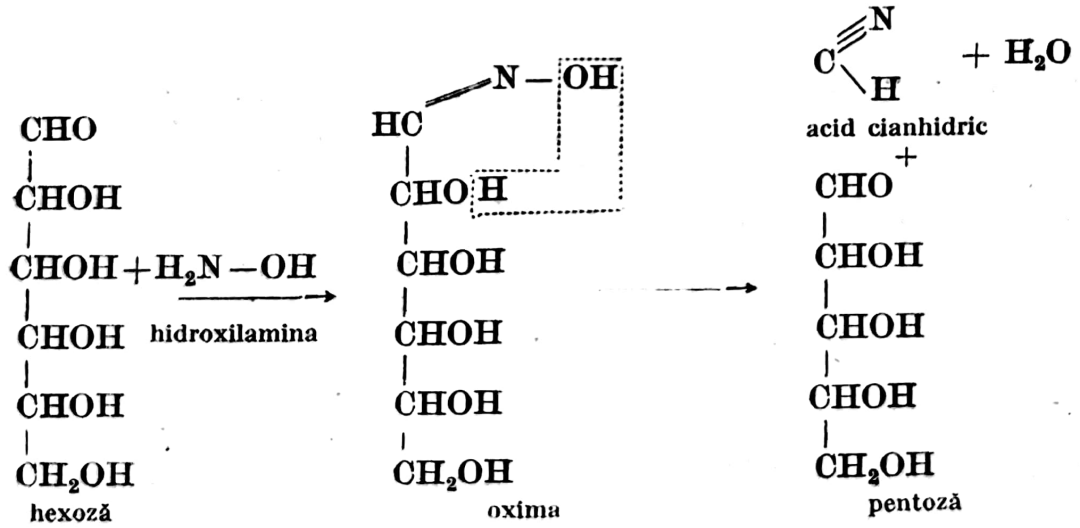
Schema reacţiilor care au loc este următoarea :



F. **Acţiunea hidroxilaminei** (H_2N-OH).

Cu hidroxilamina, monozaharidele formează *oxime*. Oximele, sub acţiunea anhidridei acetice şi a acetatului de sodiu, se deshidratează formând *nitrilii* corespunzători; aceştia, sub acţiunea azotatului de argint amoniacal, scindează gruparea CNH, scurtând astfel molecula ozei cu un C şi formează alte oze cu un carbon mai puţin decât oza de plecare (degradarea lui Wohl). Aceasta poate constitui deci o metodă de sinteză a ozelor cu un C mai puţin decât ozele de plecare, după cum sinteza cianhidrinică permite sinteza ozelor cu un C mai mult decât cele de plecare.

Reacţia este următoarea :



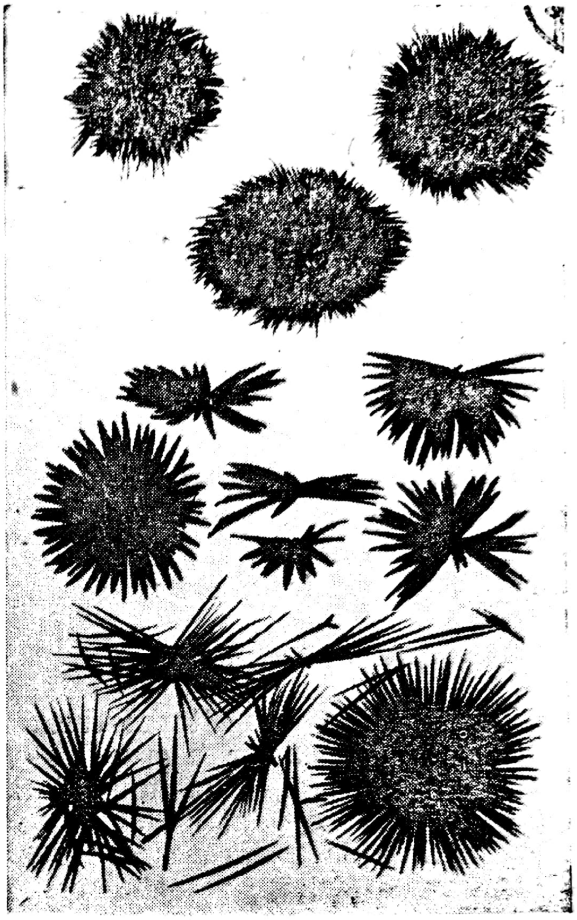
G. **Acţiunea hidrazinei**

Sub acţiunea hidrazinei, ozele dau *hidrazone* şi *ozazone*, compuşi cristalizaţi, frecvent utilizaţi pentru identificarea şi diferenţierea zaharurilor.

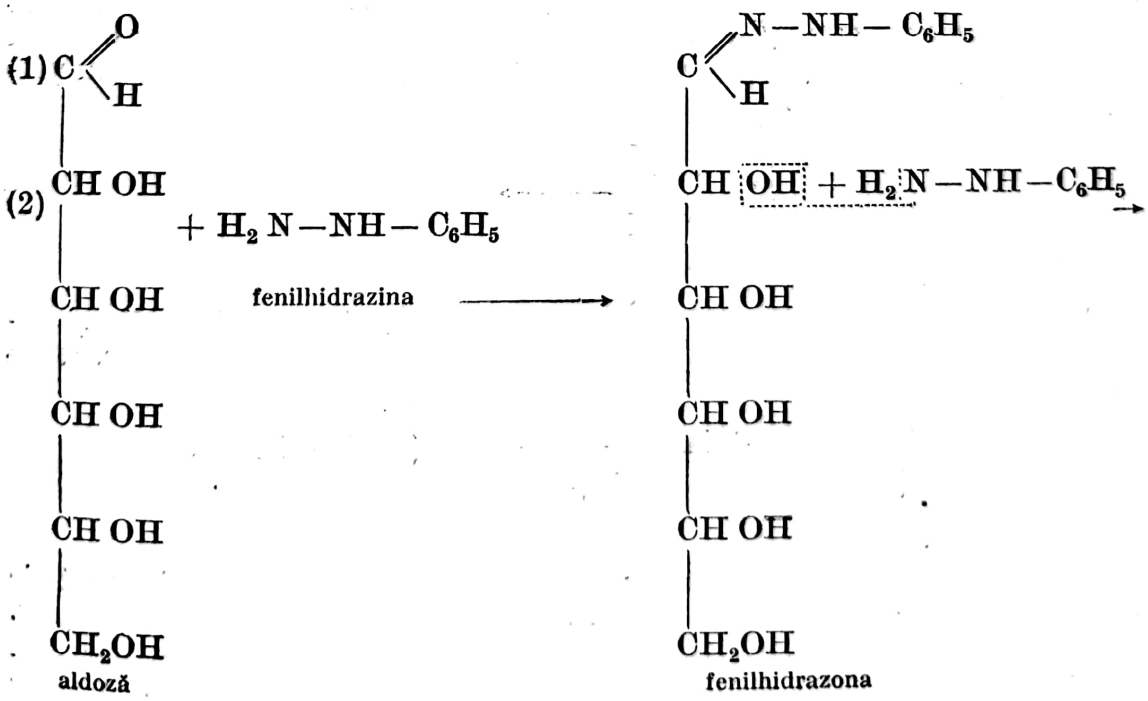
Fenilhidrazina $H_2N-NH-C_6H_5$, acţionând la rece în proporţii echimoleculare asupra monozaharidelor (o moleculă de fenilhidrazină

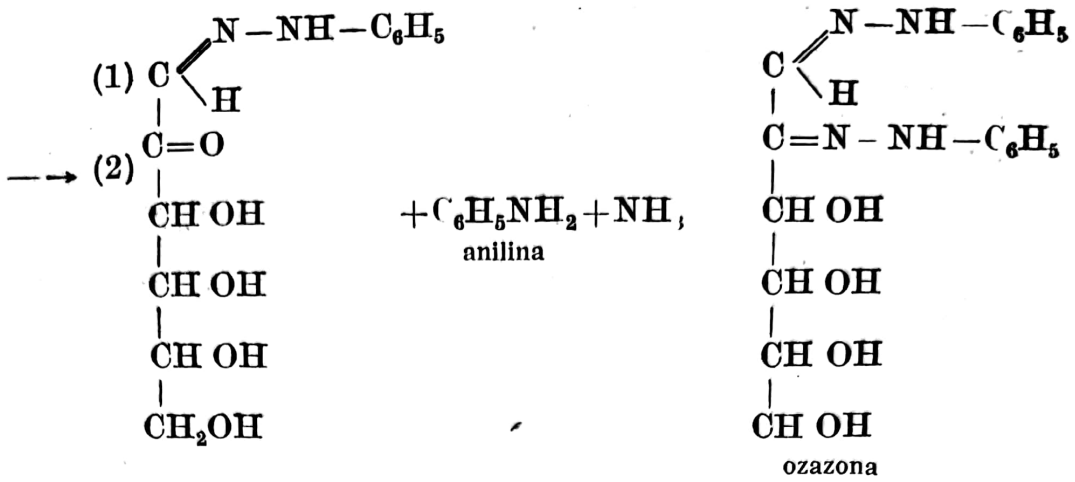
cu o moleculă de monozaharid), formează hidrazone, produse cristalizate cu activitate optică și punct de fuziune caracteristice fiecărui monozaharid în parte, ceeace permite diferențierea lor.

In exces de fenilhidrazină, în mediu slab acid (CH_3COOH) și la cald, hidrazona formată se unește cu o altă moleculă de fenilhidrazină și formează compuși cristalizați numiți ozazone, ale căror puncte de fuziune, solubilitate și aspecte ale cristalelor diferă dela zahar la zahar—fapt care se utilizează frecvent pentru identificarea și izolarea zaharurilor din amestecuri (fig. 31). Reacțiile care au loc și care duc la formarea acestor compuși sunt următoarele : o moleculă de fenilhidrazină se fixează la gruparea carbonilică a ozei cu formare de fenilhidrazonă ; o altă moleculă de fenilhidrazină oxidează funcția alcoolică dela carbonul vecin grupării carbonilice, formând o altă grupare carbonilică ; aceasta va fixa la rândul ei o a doua moleculă de fenilhidrazină, formând ozazona :



Sus : glucozazone. *Centru* : maltozazone. *Jos* : lactozazone.
Fig. 31 Ozazone.





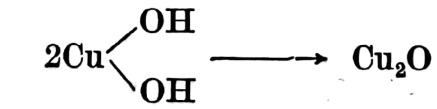
La formarea ozazonelor intervin în reacție numai C (1) și C (2), deci toate ozele care au restul moleculei identic, deși au grupările la C_1 și C_2 diferite, vor *avea ozazone identice* (de exemplu, *glucoza, fructoza* și manoza au ozazone identice din cauza analogiei acestui fragment din molecula lor).

H. Proprietățile reducătoare

Proprietățile reducătoare caracteristice glucidelor sunt datorite prezenței în molecula lor a *grupării aldehidice sau cetonice,* grupări care au capacitatea de a se oxida cu ușurință, fie fixând oxigenul din alți compuși, fie cedând hidrogenul lor altor compuși (deci reducându-i pe aceștia).

Proprietățile reducătoare ale monozaharidelor sunt folosite pentru identificarea lor, iar reactivii cel mai frecvent utilizați pentru această identificare în laborator sunt soluțiile alcaline ale unor ioni metalici, cum sunt cuprul, bismutul, mercurul, argintul. Frecvent folosite sunt:

1. **Licoarea Fehling,** constituită dintr'o soluție de sulfat de cupru și tartrat dublu de sodiu și potasiu în mediu alcalin. Acest amestec duce la formare de *oxid cupric* (Cu O. H_2O) care sub acțiunea zaharurilor poate fi redus la oxid cupros (Cu_2O), compus care se depune sub forma unui precipitat roșu-cărămiziu:



hidroxid cupric — oxid cupros

2. **Soluția Nylander** conține azotat de bismut, tartrat de sodiu și potasiu în mediu alcalin (NaOH); în prezența unui zahăr reducător, sarea de bismut e redusă la bismut metalic, negru:

$$Bi(OH)_2NO_3 + KOH \dashrightarrow Bi(OH)_3 + KNO_3$$
$$2\,Bi(OH)_3 \xrightarrow{-O} 2Bi + 3H_2O$$

3. **Soluțiile de azotat de argint amoniacal** sunt reduse la argint metalic de către zaharuri formând pe pereții vasului de reacție o oglindă de argint.

Aceste sisteme folosesc reducerea oxizilor metalici ca test pentru zaharuri. Compușii organici adăugați (acidul tartric de exemplu), care conțin grupuri OH în moleculă, în soluție

alcalină reacţionează cu hidroxizii metalici, formând un complex slab disociat care liberează însă ionii metalului în suficientă cantitate pentru a permite reacţia de reducere.

Formarea acestui complex este la baza reacţiilor de acest tip. Alcalii din soluţia acestor reactivi desfac molecula zaharurilor în fragmente care pot deasemenea reduce ionii metalici.

I. Fermentaţia zaharurilor

Este o caracteristică şi importantă proprietate a acestei clase de substanţe. Se realizează sub acţiunea unor enzime specifice şi duce la formarea de CO_2 şi alcool, ca produse finale. Astfel, sub acţiunea zimazei din drojdia de bere, monozaharidele suferă aşa numita *fermentaţie alcoolică* cu formare de CO_2 şi alcool etilic :

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\ C_2H_5OH + 2\ CO_2$$

Zimaza poate acţiona numai asupra triozelor şi hexozelor, iar dintre hexoze sunt fermentate numai izomerii *d*. Astfel, în glucoza racemică este transformată numai componenta *d*, iar izomerul *l* rămâne nescindat. Fructoza şi glucoza sunt uşor fermentescibile, galactoza mai greu fermentescibilă.

CONSTITUŢIA ŞI STRUCTURA MONOZAHARIDELOR (OZELOR)

Cu privire la constituţia şi structura monozaharidelor se cunosc următoarele :

1. Au în general o *catenă neramificată*. Se cunosc numai două monozaharide naturale ramificate.

2. *Conţin grupări alcoolice* $\left(\diagup\!\!\diagdown C-OH\right)$. Funcţiile alcoolice au fost identificate prin reacţiile caracteristice, şi anume, formarea de esteri, eteri, etc., proprietate utilizată pentru sinteză şi stabilirea structurii ozelor.

Un *ester* se ştie că este un compus rezultat dintr'un alcool şi un acid prin eliminarea unei molecule de apă : de exemplu, esterii monozaharidelor cu acidul fosforic. Esterii fosforici au importanţă fundamentală în metabolismul glucidelor.

Un *eter* este un compus rezultat din doi alcooli prin eliminarea unei molecule de apă.

Grupările alcoolice din molecula monozaharidelor sunt grupări alcoolice libere.

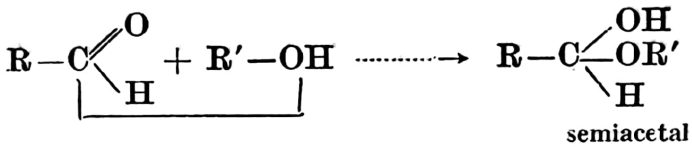
3. *Conţin grupări aldehidice* $\begin{matrix} H \\ R \end{matrix}\!\!\diagdown C=O$ sau *cetonice* $\begin{matrix} R \\ R \end{matrix}\!\!\diagdown C=O.$

Identificarea acestor grupări se face deasemenea prin reacţiile caracteristice acestora. Cu acest prilej s'a constatat însă că monozaharidele nu dau chiar toate reacţiile caracteristice grupărilor aldehidice sau cetonice, ci numai unele din ele. Astfel, dau reacţiile cu hidroxilamina, adică formează oxime, dau reacţiile cu fenilhidrazina, adică formează ozazone, nu dau însă reacţia de recolorare în roşu a fuxinei prealabil decolorate de SO_2 (anhidrida sulfuroasă), reacţie extrem de sensibilă şi caracteristică grupării aldehidice sau cetonice libere. Acest fapt, precum şi alte date experimentale, pe care le vom vedea ulterior, au dus la concluzia că în molecula monozaharidelor gruparea aldehidică sau cetonică, deşi existentă,

este mascată, aşa fel încât nu poate fi pusă în evidenţă decât în anumite condiţii experimentale. Monozaharidele nu sunt deci aldehide sau cetone adevărate, ci *pseudoaldehide* sau *pseudocetone,* în care funcţia aldehidică sau cetonică este mascată printr'o legătură intramoleculară a acestor funcţii. S'a admis astfel că (1) gruparea carbonilică C = O ar exista iniţial sub forma unei grupări hidroxilice $\rangle C - OH$ speciale, numită *hidroxil glicozidic* sau *hidroxil semiacetalic* cu însuşiri deosebite de ale hidroxilului obişnuit, şi (2) între carbonul grupării carbonilice şi alt carbon din moleculă s'ar forma un ciclu prin intermediul oxigenului.

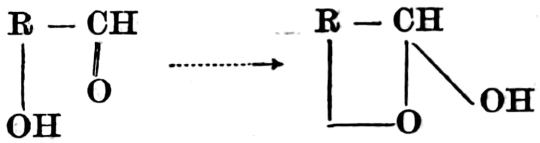
Se formează astfel compuşi cu structură specială cunoscuţi sub numele de semiacetali.

Se numeşte *„semiacetal"*, în general, compusul rezultat dintr'o grupare alcoolică şi o grupare carbonilică :



semiacetal

In cazul când această reacţie are loc între gruparea carbonilică şi alcoolică din interiorul aceleiaşi molecule, cum este cazul monozaharidelor, se formează ceeace se numeşte un *„semiacetal ciclic"*, care se scrie astfel :



semiacetal ciclic

Această formulare constitue aşa numita *„formulare ciclică"* sau *„semiacetalică"* a moleculei monozaharidelor.

Ciclul semiacetalic se realizează în etape intermediare, prin formarea unor compuşi intermediari instabili, care ar conţine la unul şi acelaş carbon două grupări oxidrilice.

Prin eliminarea unei molecule de apă între unul din aceşti oxidrili şi oxidrilul altui carbon din moleculă se stabileşte între aceşti doi atomi de carbon, dintre care unul carbonilic, o legătură prin intermediul unui oxigen.

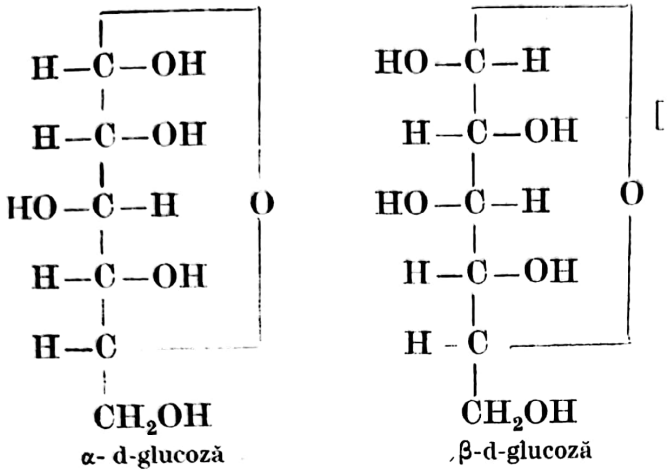
Se formează prin această reacţie o punte de legătură, se stabileşte un ciclu oxigenat de structură semiacetalică.

Pentru formularea ciclică a monozaharidelor există următoarele argumente experimentale.

1. Deşi aldehide sau cetone, ele nu dau toate reacţiile caracteristice grupării lor funcţionale, şi anume, nu dau una din cele mai sensibile, aceea de recolorare a fuxinei decolorate în prealabil cu anhidridă sulfuroasă (SO_2) sau o dau extrem de lent şi numai în concentraţii foarte mari.

2. Prezintă fenomenul mutarotației, fenomen care nu se poate interpreta decât atribuind monozaharidelor o structură ciclică semiacetalică.

Mutarotația



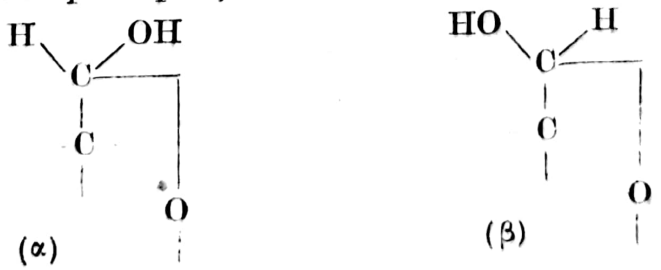
α- d-glucoză β-d-glucoză

$[\alpha]_D^{2,0} = +113°.4$ $[\alpha]_D^{t°} = +19°$

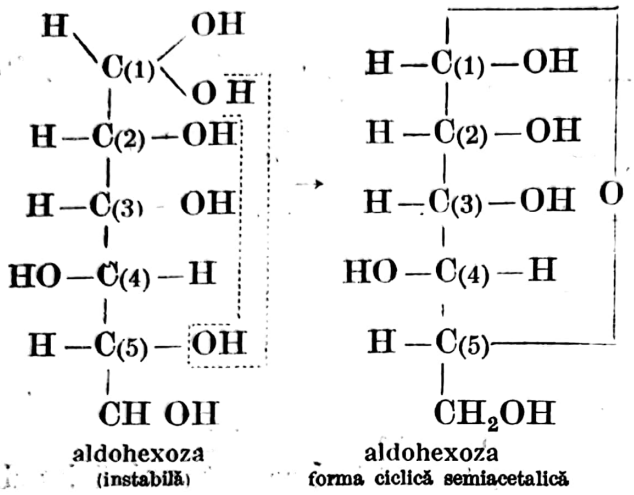
$[\alpha]_D^{t°} = 52.5°$

Să vedem în ce constă acest fenomen al mutarotației.

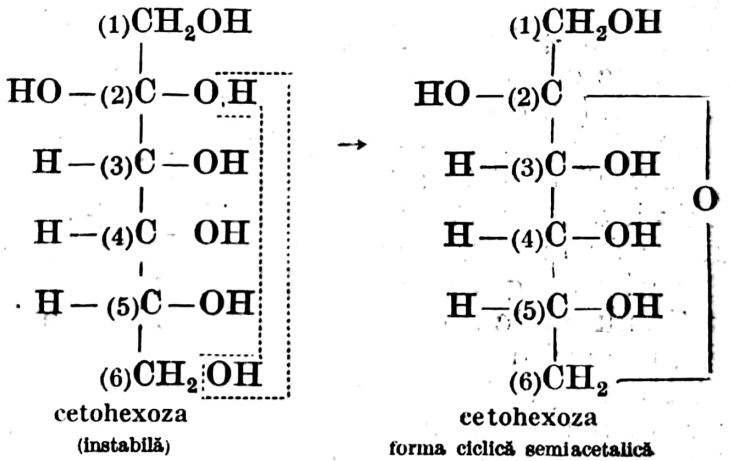
Dacă se disolvă în apă d-glucoza cristalizată şi se determină imediat puterea rotatorie, se găseşte pentru $(\alpha)_D^{20°}$ puterea rotatorie specifică în valoare de + 113°4. Această valoare scade după scurtă vreme la + 52° şi rămâne constantă. Acest fenomen nu se poate explica decât admițând că, în soluție, d-glucoza există sub forma a doi *izomeri* optic activi, unul α cu rotația specifică + 113°4, celălalt β cu rotația specifică + 19°, care se transformă unul în altul până ce se atinge o stare de echilibru dinamic, căruia îi corespunde valoarea finală de + 52°5′. Fenomenul acesta poartă numele de mutarotație şi se constată nu numai la glucoză, dar la toate zaharurile cu grupare aldehidică sau cetonică liberă în moleculă. Mutarotația nu poate fi explicată decât pe baza existenței în soluția de glucoză a doi izomeri optic activi, cărora le corespund câte doi alți izomeri optic activi diferiți. Formularea liniară în catenă deschisă a monozaharidelor prevede însă pentru glucoză, care are 4 carboni asimetrici, 2^4 izomeri, adică 16 *stereoizomeri*, dar nu prevede alți doi pentru fiecare din acești 16, așa cum ar rezulta din fenomenul mutarotației. Numai o formulare ciclică a moleculei de glucoză prevede această posibilitate, deoarece această formulare creează un al cincilea carbon asimetric care determină existența acestor doi izomeri optici supranumerari. Astfel, dacă se examinează formula în ciclul închis, semiacetalică, a glucozei, se constată că oxidrilul carbonului carbonilic poate să fie fixat la dreapta sau la stânga punții oxidice, ceeace creează în moleculă două asimetrii posibile, deci doi stereoizomeri. Acești doi stereoizomeri sunt notați cu literele α şi β. Izomerul α are — OH oxidrilul de aceeaşi parte cu oxigenul punții oxidice, izomerul β are OH de partea opusă punții oxidice :



Toate monozaharidele pot exista sub cele două forme stereoizomere α şi β. Aceste două forme pot trece însă cu uşurinţă una în alta, ceeace arată că forma de punte oxidică nu este prea stabilă şi este probabil, că intermediar trecerii dela o formă la alta,



aldohexoza (instabilă) — aldohexoza forma ciclică semiacetalică



cetohexoza (instabilă) — cetohexoza forma ciclică semiacetalică

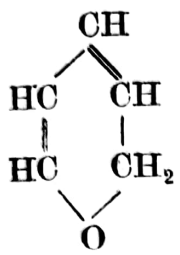
apare în soluţie şi forma în catenă deschisă a monozaharidelor, având gruparea lor aldehidică, respectiv cetonică, liberă. Acestei fracţiuni glucidice cu gruparea carbonilică liberă aflate în soluţie, i se datoreşte faptul că glucidele au reacţii comune cu ale aldehidelor şi cetonelor adevărate.

Forma piranozică şi furanozică a monozaharidelor

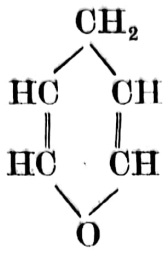
Dacă se notează carbonii monozaharidelor cu numere, şi anume carbonul carbonilic la aldoze cu *1*, iar la cetoze cu *2*, ceilalţi carboni fiind notaţi în ordine succesivă cu numerele 3, 4, 5, 6...etc., puntea oxidică se poate stabili la aldoze între carbonul carbonilic *1* şi carbonul *5* sau *4*, iar la cetoze între carbonul carbonilic *2* şi carbonul *6* sau *5*. In cazul când puntea oxidică închide un lanţ de 5 atomi de carbon, se obţine forma *piranozică* a glucidelor, iar dacă puntea oxidică închide un lanţ de 4 atomi de carbon se obţine forma *furanozică* a glucidelor. Forma piranozică cuprinde în ciclu cinci carboni şi un oxigen, forma furanozică patru carboni şi un oxigen, constituind deci un heterociclu oxigenat. Denumirea de ciclu piranozic şi furanozic derivă dela prototipul acestor heterocicluri

oxigenate care sunt respectiv piranul și furanul (ciclul piranozic și furanozic) (Haworth).

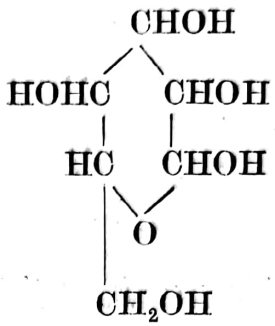
Ciclul piranic



α-piran

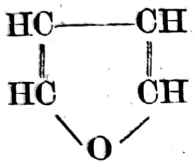


γ-piran

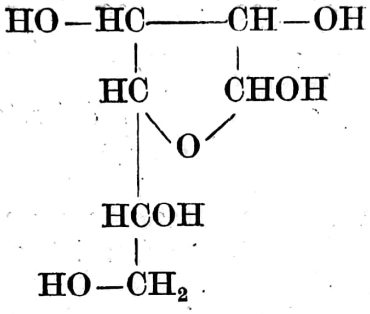


aldo-hexo-piranoză

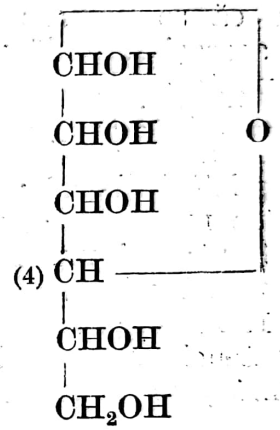
Ciclul furanic



furan



furanoză



aldo-hexo-furanoză

Forma piranozică este mai stabilă decât cea furanozică. In afară de forma furanozică ar mai exista și alte forme mai labile, și anume acelea în care puntea oxidică se stabilește între C_1 și C_3 sau C_4. Aceste forme sunt așa numitele forme γ (deoarece se notează uneori carbonul carbonilic C_1 cu α, atunci C_3 e γ). Se mai numesc aceste zaharuri și *alloiomorfe* (alloios = = capabile de a se transforma) și se notează cu prefixul *am* — sau h-*zaharuri*, dela noțiunea de heterozaharuri. Cum forma furanozică a monozaharidelor este mai nestabilă, acestea se găsesc în stare liberă, în special sub formă piranozică sau în sisteme în echilibru ale ambelor forme.

Formularea spațială a monozaharidelor

Formularea ciclică a monozaharidelor, realizată pentru prima oară de Tollens, nu indică orânduirea reală a atomilor în spațiu, așa cum a fost pusă în evidență cu ajutorul razelor X. Haworth (1932) propune o formulare spațială, o formulare în perspectivă a moleculelor piranozice și furanozice, formulare în care ciclul furanozic e reprezentat ca un pentagon, iar cel piranozic ca un *hexagon*. Ciclul este pe de altă parte imaginat ca fiind perpendicular pe planul hârtiei, locul fiecărui carbon fiind notat cu numărul de ordine corespunzător. Examinarea cu raze X arată că cei 5 atomi ai ciclului piranozic sunt în același plan, pe când atomul de oxigen

este pe alt plan. Grupările H şi OH sunt deasupra şi dedesubtul planului atomilor de carbon. Valenţele care leagă atomii aflaţi în planul din faţa şi deasupra planului ciclului se înseamnă cu linii *groase*, iar valenţele de dedesubtul acestui plan prin linii subţiri. *Oxidrilul* dela carbonul carbonilic C_1 la aldoze şi C_2 la cetoze, la forma *piranozică sau furanozică a acestora*, poate avea două poziţii, una din poziţii deasupra planului ciclului OH alta dedesubtul planului ciclului, explicând astfel existenţa izomerilor α şi β, după cum OH-ul carbonului carbonilic va fi în sus şi de C aceeaşi parte cu O punţii oxidice (izomerul α) sau în jos şi în opoziţie cu oxigenul punţii oxidice (izomerul β).

Stabilirea configuraţiei sterice a monozaharidelor

Inainte de a discuta stabilirea configuraţiei sterice a monozaharidelor, reamintim câteva din noţiunile importante în legătură cu izomeria. Se ştie că se numesc izomeri (isos = aceeaşi, meros = poziţie) compuşii cu aceeaşi formulă moleculară, dar cu proprietăţi diferite. Izomeria nu se poate explica decât admiţând că, în molecula substanţelor izomere, atomii, deşi sunt aceeaşi, ocupă *poziţii diferite* în raport unii cu alţii. Acest lucru explică dece compuşi cu formula brută identică au totuşi proprietăţi diferite; formula brută nu poate pune în evidenţă diferenţele dintre molecule, ci numai formularea structurală a acestora.

Sunt mai multe tipuri de izomerie: izomerie de catenă; izomerie de poziţie; izomerie sterică.

1. *Izomerie de catenă* este izomeria în care are loc o ramificaţie diferită a catenei de carboni din moleculă. Exemplu de formă normală „*n*" şi formă „*izo*": butan normal şi izobutan:

$$CH_3-CH_2-CH_2-CH_3 \qquad CH_3-CH(CH_3)-CH_3$$

butan normal — izobutan

2. *Izomeria de poziţie* se găseşte la compuşii cu grupări funcţionale caracteristice, grupări funcţionale care pot ocupa în moleculă poziţii diverse. De exemplu, legătura dublă la hidrocarburile nesaturate:

$$CH_2=CH-CH_2-CH_3 \quad \text{şi} \quad CH_3-CH=CH-CH_3$$

buten 1 — buten 2

3. *Izomeria sterică.* Acest tip de izomerie este condiţionat de o orânduire diferită a atomilor în spaţiu — dacă se socoate ca model al atomului de C modelul atomului tetraedric. Izomeria sterică poate fi de două feluri: izomerie geometrică şi izomerie optică.

a) *Izomeria geometrică* este întâlnită la compuşii cu dublă legătură; sunt aşa zişii izomeri „cis" şi „trans", care se deosebesc între ei prin proprietăţile lor fizice şi chimice în general, dar nu şi prin activitate optică.

b) *Izomeria optică* este constatată la substanţele optic active, substanţe care există totdeauna sub două forme având aceleaşi proprietăţi chimice, dar proprietăţi optice diferite. Una din forme deviază planul luminii polari-

zate la dreapta, deaceea se numeşte *dextrogiră* şi se nota iniţial cu *d* (+). Cealaltă se numeşte *levogiră*, deviază planul luminii polarizate la stânga şi se nota iniţial cu *l*(—). Activitatea optică a substanţelor în soluţie este datorită unei disimetrii moleculare, unei orânduiri speciale a atomilor în moleculă, aşa cum a arătat Louis Pasteur.

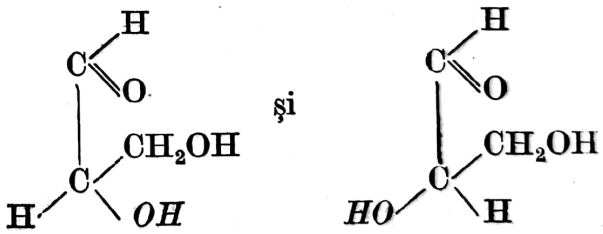
Moleculele care posedă o orânduire spaţială asimetrică prezintă forme de izomerie optică. Prezenţa atomului de carbon asimetric conferă întregii molecule activitate optică, adică proprietatea de a roti planul luminii polarizate. Moleculele cu mai mulţi atomi de carbon asimetric în moleculă au mai mulţi izomeri optic activi, fiecare din carbonii asimetrici păstrându-şi activitatea sa proprie. Efectul optic total al moleculei este dat de suma algebrică a acţiunii fiecărui atom asimetric. Când toţi atomii de carbon asimetric sunt dextrogiri sau toţi levogiri, acţiunea lor se însumează; când unii din ei sunt dextrogiri şi ceilalţi levogiri, acţiunea lor se scade. Numărul izomerilor optici ai unui compus cu n carboni va fi egal cu 2^n (Van't Hoff). La aceştia se mai adaugă formele racemice, adică formele inactive din punct de vedere optic şi care sunt rezultate din amestecul în proporţii egale al celor două forme optic active de semn contrar, ce se compensează reciproc.

Formele racemice au simbolul (*r*) sau mai corect (*d*, *l*).

Stabilirea configuraţiei sterice a compuşilor optic activi este importantă în special din punct de vedere biologic, deoarece, în transformările metabolice ale compuşilor biologici, organismul viu are capacitatea de a utiliza numai una din formele optic active ale unuia şi aceluiaş compus. Pentru stabilirea configuraţiei sterice s'a convenit să se aleagă ca substanţă standard de comparaţie glicerinaldehida dextrogiră (D), având oxidrilul în dreapta şi glicerinaldehida levogiră cu oxidrilul în stânga (L).

Formularea spaţială a acestor două glicerinaldehide este:

S'a ales acest standard de comparaţie fiind cel mai simplu compus cu un singur carbon asimetric care prezintă cele două forme optic active ce pot fi transformate cu uşurinţă în compuşii cu moleculă mai mare cărora vrem să le determinăm configuraţia.



S'a convenit să se noteze cu litera *D* sau *d* înainte, toţi compuşii optic activi având aceeaşi configuraţie la carbonul asimetric, vecin grupării de alcool primar — CH_2OH din moleculă, ca în glicerinaldehida dextrogiră, şi cu litera *L* sau *l* înainte, toţi compuşii care au aceeaşi configuraţie la carbonul asimetric vecin grupării alcool primar —CH_2OH, ca în molecula aldehidei levogire. Literele *D* şi *L*, puse înaintea numelui compusului, indică numai configuraţia sterică, nu însă şi sensul activităţii optice, deoarece în molecula compuşilor cu mai mulţi atomi de carboni asimetrici acest sens e rezultanta însumării acţiunii tuturor acestor atomi asimetrici. Există posibilitatea de a avea compuşi cu aceeaşi configuraţie *d* sau *l* ca în molecula glicerinaldehidei, dar cu activităţi optice diferite, şi anume forme *d* care pot roti planul luminii polarizate la dreapta sau la stânga, precum şi forme *l* care pot roti deasemenea acest plan la dreapta sau la stânga. Din acest motiv s'a convenit a se pune simbolul (+) înaintea

numelui substanțelor care rotesc planul luminii polarizate la dreapta și simbolul (—) pentru acelea care îl rotesc la stânga.

Sunt deci compuși *d*(+) și *d*(—) precum și *l*(+) sau *l*(—), după cum au aceeași configurație sterică cu *d*(—) sau *l*(—) glicerinaldehida, dar rotesc planul luminii polarizate la dreapta sau la stânga. Zaharurile naturale aparțin în general configurației *d*(+) sau *d*(—).

SINTEZA MONOZAHARIDELOR

In laborator, sinteza unui monozaharid a fost realizată prima oară de Butlerov (1861) și apoi de H. O. L. Fisher (1936). Acesta din urmă a obținut *dl* fructoza și *dl* sorboza prin condensarea *d*-glicerinaldehidei cu dioxiacetona.

In natură, sinteza zaharurilor se realizează în celulele plantelor verzi din CO_2 și apă printr'un proces de *fotosinteză* sub acțiunea razelor solare. Este procesul cel mai important prin care se trece dela lumea anorganică la aceea organică. Soarele procură energia care în interiorul celulei este transformată în energie chimică. Socotind că glucoza este zaharul care se formează inițial din combinarea CO_2 cu H_2O, sub acțiunea razelor solare, reacția se poate reprezenta schematic astfel:

$$6\,CO_2 + 6\,H_2O \longrightarrow \text{Glucide } (C_6H_{12}O_6) + \text{Oxigen } (O_2)$$

$$\downarrow \qquad \downarrow \qquad\qquad\qquad \downarrow \qquad \downarrow$$

$$\text{Energie chimică} + \text{Energie chimică} + \left\{\begin{array}{l}\text{Clorofilă}\\ \uparrow\\ \text{Energie solară}\end{array}\right. \rightarrow \text{Energie chimică} + \text{Energie chimică}$$

Nicio altă reacție în natură nu este atât de fundamentală ca această reacție de fotosinteză. Prin această reacție și numai prin aceasta natura captează o parte din energia solară și o depozitează sub formă de energie chimică în oxigenul format.

Experiențe cu oxigen izotop ^{18}O (oxigen greu) ar arăta că oxigenul format în timpul procesului de fotosinteză derivă din apa care intră în reacție și nu din CO_2.

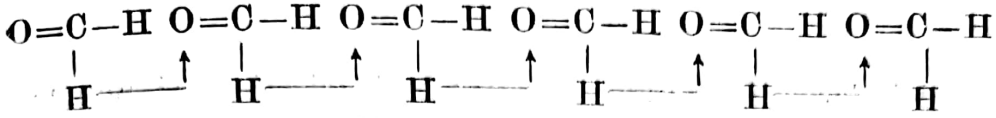
In acest chip, energia solară este făcută accesibilă pe calea oxigenului (ca energie chimică deci) pentru transformări ulterioare în celulă în diversele forme de energii care sunt esențiale vieții. Se apreciază la *60 bilioane kg* cantitatea de CO_2 asimilată anual de plante, cantitatea totală de CO_2 din atmosferă fiind de *2100 bilioane kg*. Această rezervă s'ar epuiza destul de repede (s'a calculat că în 40 de ani) dacă nu s'ar reface permanent prin respirație și putrezirea plantelor.

Ca rezultat final al asimilării CO_2 rezultă un polizaharid, amidonul, format dintr'un număr extrem de mare de molecule de glucoză unite între ele.

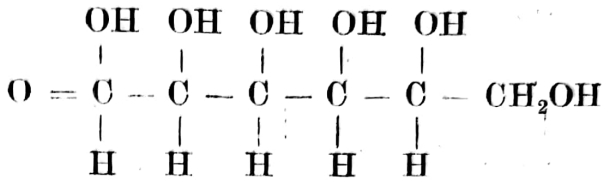
Etapele formării amidonului ar fi:

$$CO_2 + H_2O \longrightarrow O_2 + C(=O)(H)(H) \longrightarrow C_6H_{12}O_6 \longrightarrow (C_6H_{12}O_6)n$$

aldehidă formică — glucoză — amidon



Condensarea aldolică a formaldehidei în glucoză



glucoză

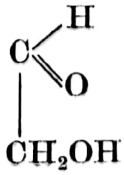
Din CO_2 şi H_2O se formează oxigen şi aldehidă formică.

Acest oxigen are rolul să reînnoiască continuu oxigenul atmosferic, fără de care viaţa aerobă ar fi imposibilă. Din aldehida formică prin condensare aldolică se formează repede glucoza, care prin polimerizare formează amidonul; acesta constitue rezerva energetică cea mai răspândită la plante. Formarea formaldehidei din CO_2 şi H_2O se face cu consum mare de energie, este o reacţie puternic endotermă, ce consumă 112 calorii, care sunt date tocmai de energia solară, de lumina solară. Deoarece atât CO_2, cât şi H_2O sunt incolore şi deci nu pot absorbi energia radiaţiilor solare, trebue să existe în plante un pigment colorat care să absoarbă această energie şi să o transmită compuşilor care reacţionează. Acest pigment este clorofila. Clorofila este sensibilizatorul care absoarbe radiaţiile şi transmite energia lor reacţiei de formare a formaldehidei din CO_2 şi H_2O, reacţie endotermă. Deoarece pigmentul este verde, el va absorbi în special radiaţiile roşii. Clorofila se găseşte în plante în anumite organite microscopice numite *cloroplaste*. Acţiunea clorofilei este condiţionată de integritatea structurii celulare. Frunzele în care celulele sunt distruse nu pot realiza asimilarea. Nu s'a reuşit o sinteză artificială cu soluţii de clorofilă a glucidelor. Compuşii glucidici sintetizaţi de plante sunt optic activi. Celula animală, spre deosebire de celula vegetală, nu poate sintetiza glucidele din compuşii elementari CO_2 şi H_2O. Este necesară o prealabilă sinteză din aceste componente în celula vegetală. Celula animală poate face numai transformările ulterioare ale compuşilor mai complecşi sintetizaţi prealabil de plante. In aceste transformări se păstrează însă totdeauna izomeria optică a compusului iniţial sintetizat de plante. De exemplu, *dl*, *d* + sau *l*.

MONOZAHARIDELE MAI IMPORTANTE

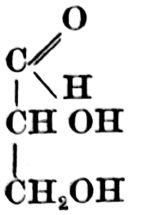
I. Bioze

Glicolaldehida sau glicoloza. Nu se găseşte în natură. Este o aldehidă-alcool cu doi atomi de carbon. Se crede că serveşte ca punct de plecare pentru polizaharizii din plante :



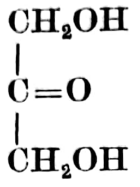
II. Trioze

Se cunosc doi derivaţi din alcoolul trivalent glicerina, şi anume: ***d-* şi *l*-glicerinaldehida şi dioxiacetona,** deci forma aldehidică şi cetonică a triozei. Am văzut că forma aldehidică a servit drept componentă standard pentru fixarea configuraţiei sterice a seriilor *d* şi *l* a zaharurilor şi în general a compuşilor cu atomi asimetrici.



glicerinaldehida sau aldehida glicerică

şi



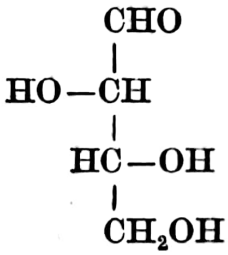
dioxiacetona

Nu se găsesc în natură sub formă liberă, ci sub forma unor esteri foarte importanţi, *esterii fosforici*, care joacă un rol fundamental în metabolismul intermediar al glucidelor în muşchi şi în fermentaţia alcoolică.

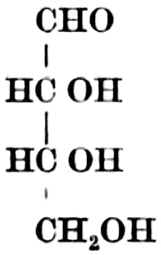
Prin oxidarea glicerolului, se poate obţine un amestec al celor două trioze numit gliceroză, care prin condensare poate fi transformată într'o hexoză, *acroza*. Aceasta, la rândul ei, se poate transforma în *d*-glucoză *d*-fructoză şi *d*-manoză (E. Fischer).

III. Tetroze

Teoria prevede patru tetroze: *d-* şi *l-treoza* şi *d-* şi *l-eritroza*:



d(-)-treoza

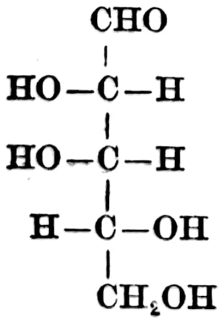


d(-)-eritroza

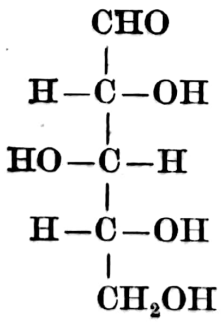
Nu se găsesc libere în natură, se cunosc alcoolii lor corespunzători.

IV. Pentoze

Au formula generală $C_5H_{10}O_5$. Se găsesc în natură în special sub formă de glicozizi polimerizaţi, constituind polizaharidele numite *pentozane* din regnul vegetal. Pentozele sunt caracterizate printr'o mare stabilitate. Ingerate din alimentaţia vegetală nu sunt utilizate de organismul animal şi se elimină ca atare prin urină. Aceasta constitue aşa numita pentozurie alimentară. Există însă şi pentozurie nealimentară, datorită unei turburări speciale a metabolismului propriu al pentozelor. Pentozele nu fermentează, ceeace indică deasemenea marea stabilitate fiziologică a acestor compuşi. Pot fi aldoze sau cetoze.



d(-)-lixoza

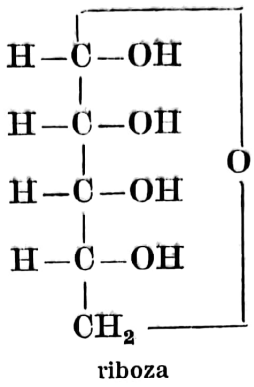


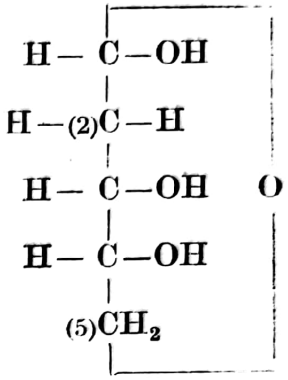
d(+)-lixoza

Lixoza, xiloza, arabinoza, riboza sunt pentoze. Incălzite cu HCl dau furfurolul care, cuplat cu orcina, fluoroglucina, etc., dă produse colorate care servesc la identificarea şi diferenţierea lor de alte zaha-

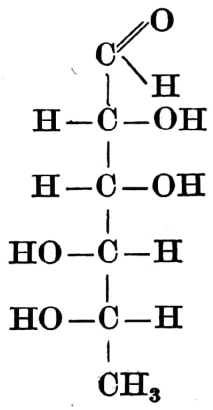
ruri. Dau ozazone cu aspect al cristalelor și puncte de topire caracteristice fiecărei pentoze. Deasemenea au activitate optică caracteristică fiecăreia. Pentozele mai importante sunt:

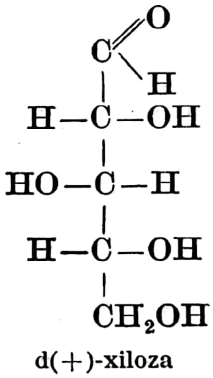
d (−) **Riboza** ($C_5H_{10}O_5$) care este o componentă importantă a acizilor nucleici din toate celulele. Se găsește aici sub forma furanozică. Acizii nucleici care conțin *d*-riboza se mai numesc și acizii nucleici din levură, unde au fost identificați prima oară, spre deosebire de acizii nucleici din timus în care riboza se găsește sub forma sa redusă, desoxiriboza sau ribodezoza sau timinoza și care are forma piranozică. Se formează din riboză prin pierderea oxigenului hidroxilic dela carbonul *2*. O metil-pentoză importantă care se găsește în plante este *ramnoza*; conține un metil substituit la gruparea CH_2OH.

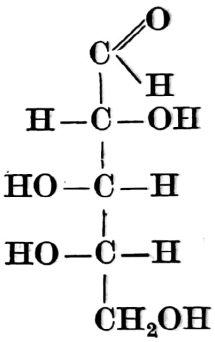

riboza


desoxiriboza

d(+) **Xiloza** ($C_5H_{10}O_5$) se găsește răspândită în natură sub forma polimerizată, *xilan*, care însoțește celuloza din lemn.


l-ramnoza


d(+)-xiloza


l-arabinoza

l-**Arabinoza** se găsește în natură sub forma polizaharidului numit *araban*. Se elimină ușor în urină după o alimentație bogată în fructe. In unele cazuri de pentozurii se elimină o arabinoză racemică. Arabinoza dă prin reducere alcoolul arabita, iar prin oxidare acidul monobazic, acidul arabilic.

V. Hexozele

Au formula brută $C_6H_{12}O_6$. Hexozele sunt monozaharidele cu 6 atomi de carbon, dintre care 4 atomi sunt asimetrici; teoretic deci pot exista $2^4 = 16$ izomeri sterici.

In laborator s'a reușit să se sintetizeze numai 14, iar în natură nu se cunosc decât trei aldohexoze cu grupare aldehidică: glucoza, manoza, galactoza, stereoizomere între ele după dispoziția celor 4 oxidrili la cei 4 carboni asimetrici și două cetohexoze, *fructoza* sau *levuloza* și *sorboza*.

d (+) **Glucoza** este cea mai importantă dintre acestea. Se mai numește și *dextroză* sau *zahăr din struguri* (fiind dextrogiră și în mare cantitate în struguri). Este extrem de importantă pentru fiziologia vegetală și animală. Este sintetizată în plante din CO_2 și H_2O.

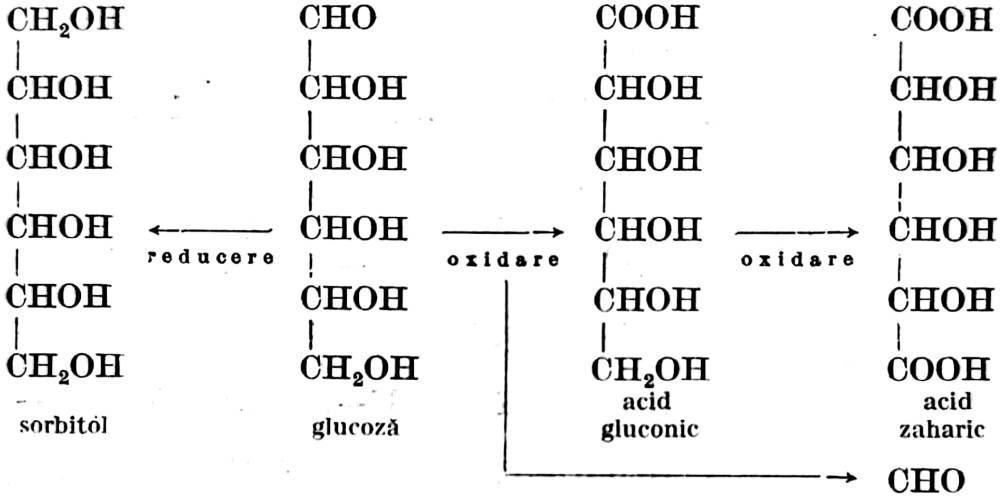
In natură se găsește sub formă liberă și sub formă polimerizată ca glicozide, din care poate fi eliberată prin hidroliză acidă sau enzimatică și ca

di,- tri- şi polizaharide. In organe se găseşte în stare liberă în concentraţii mici, în sânge între 0,7—1,20 g $/_{00}$. In urină nu apare decât în anumite boli (în diabet), unde poate atinge valori foarte mari. Industrial se prepară glucoza prin hidroliza amidonului cu HCl, la autoclav, la o presiune de 2 atmosfere. O soluţie de glucoză în apă conţine cel puţin cinci forme diverse ale acestei substanţe : α şi β-*glucopiranoză*, mici cantităţi de α şi β-*glucofuranoză*, mici cantităţi de glucoză cu catenă deschisă, cu gruparea aldehidică liberă.

Prin oxidare la alcoolul primar glucoza dă acidul *d*-glicuronic, prin oxidare la gruparea aldehidică, acidul gluconic, iar prin oxidare mai intensă acidul zaharic cu două grupări COOH terminale.

Prin reducere, alcoolul hexavalent *d*-sorbitolul.

Acidul glicuronic rezultă şi în organism prin oxidarea glucozei şi se elimină conjugat cu fenol (mecanism de desintoxicare) :



Am văzut că glucoza prezintă în soluţie mutarotaţie. Puterea sa rotatorie specifică este egală cu 52°5 la 20°. Forma piranozică ar fi forma inactivă şi stabilă a glucozei, şi se crede că ar fi forma circulantă a glucozei sanguine. Forma activă ar fi cea furanozică, care nu există în stare liberă, sau cea liniară. Transformarea inelului piranic în furanic sau în formă liniară ar fi prima fază de transformare a glucozei pentru utilizarea ei.

Testurile folosite pentru punerea în evidenţă a glucozei sunt în general cele specifice zaharurilor. Testul specific este formarea glucozazonei prin acţiunea fenilhidrazinei la cald ; apar după răcire cristale în formă de ace lungi, aşezate în genere în formă de rozetă, insolubile în apă caldă şi având un punct de topire egal cu 230°.

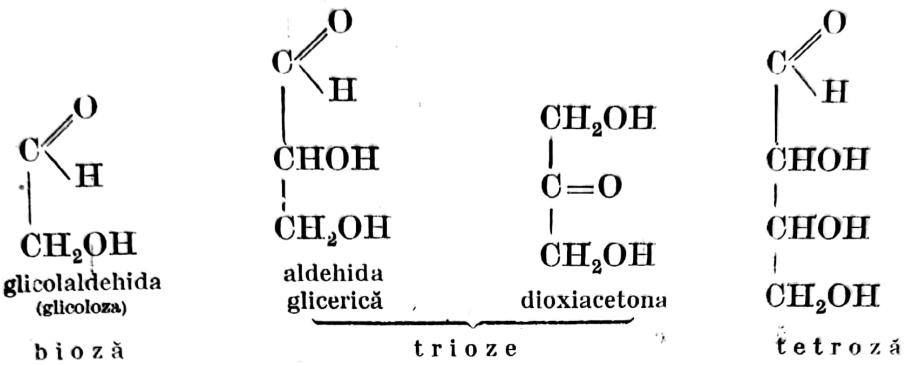
Testurile de reducere sunt acelea folosite pentru zaharuri reductoare în general, şi anume soluţii alcaline ale metalelor grele (reacţia Fehling, reacţia Benedict, reacţia Nylander). Glucoza suferă fermentaţia alcoolică şi proprietatea aceasta poate fi folosită deasemenea ca test.

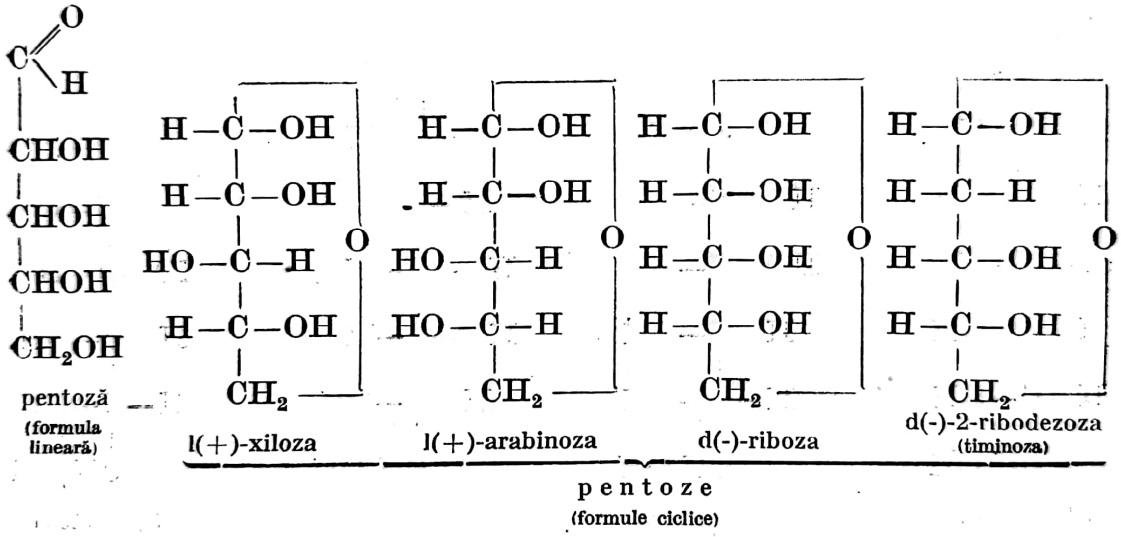
d (+) **Manoza.** $C_6H_{12}O_6$. Este o aldohexoză. Se găseşte la plante nu sub formă liberă, ci sub forma polizaharidelor numite *manane*. Este o componentă a pereţilor duri ai celulelor unor plante.

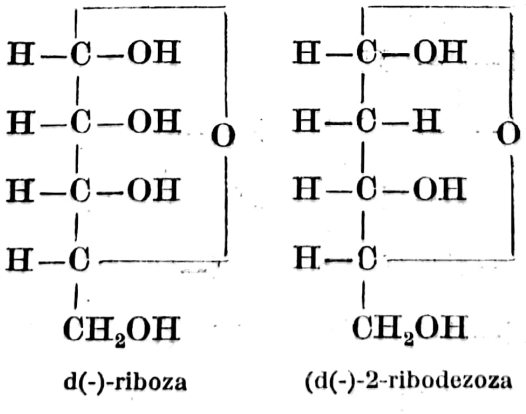
Din bacilul tuberculos s'a izolat un polizaharid care conţine manoză.

Prin reducere dă alcoolul hexavalent *manita*, iar oxidată dă acidul *manonic* şi *manozaharic*.

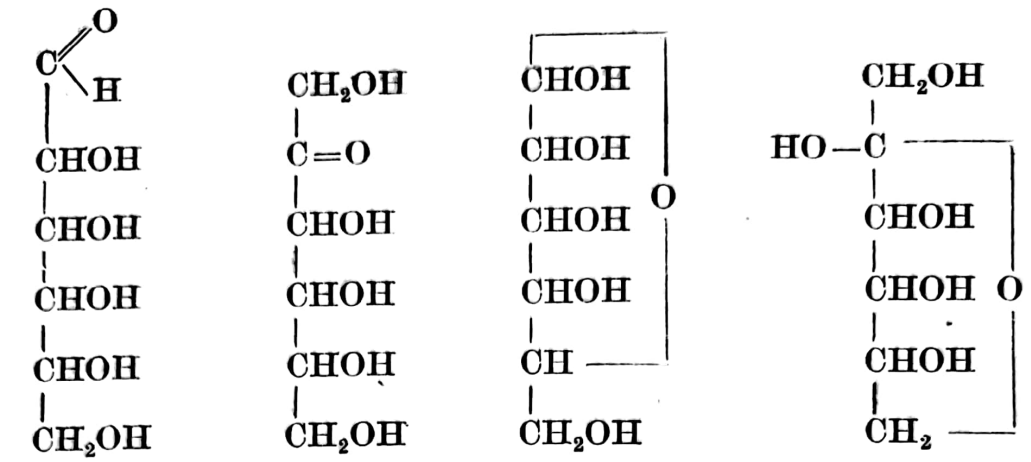
Fenilhidrazona manozei, spre deosebire de aceea a glucozei, este insolubilă în apă la temperatura camerei, ceeace servește la diferențierea sa de glucoză, cu care, fiind epimeră, dă aceeași osazonă.







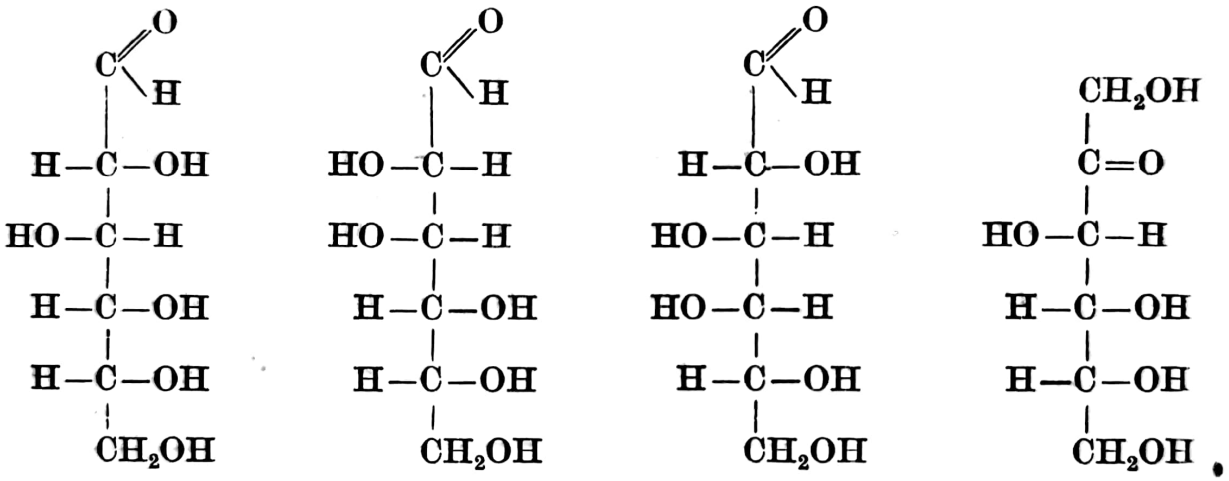
(formula ciclică cu puntea de oxigen între C_1 și C_4 formă sub care se găsesc în acizii nucleici).



aldohexoză — cetohexoză — aldohexoza — cetohexoza

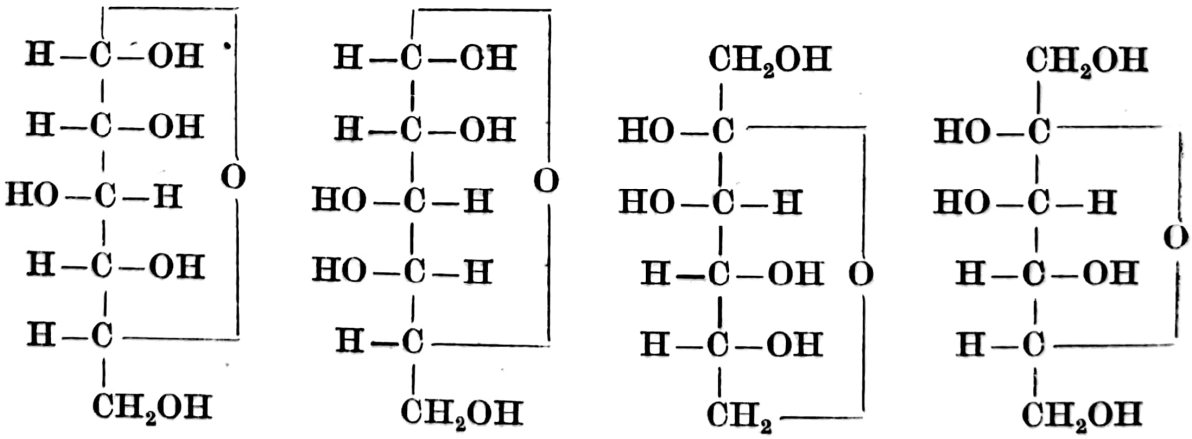
formule liniare — formule ciclice

hexoze



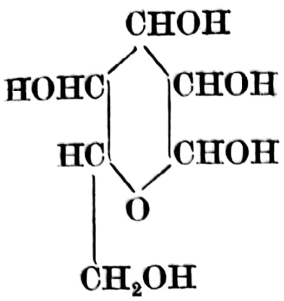
d(+)-glucoza — d(+)-manoza — d(+)-galactoza — d(-)-fructoza

formule liniare

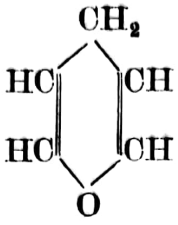


glucoza — galactoza — fructoza — fructofuranoza

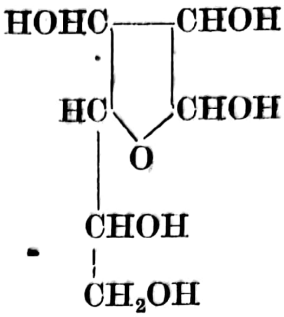
formule ciclice piranozice



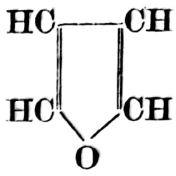
ciclu piranozic



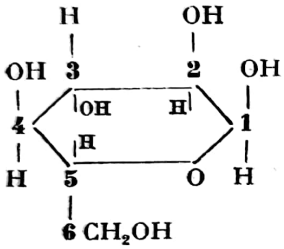
heterociclu piranic



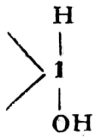
ciclu furanozic



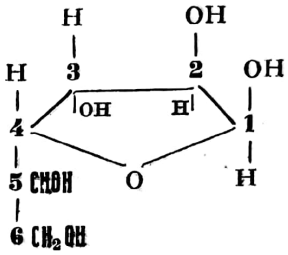
heterociclu furanic



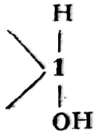
α-d-glucopiranoza



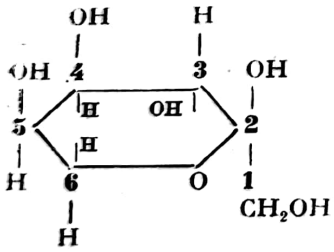
β-d-glucopiranoza



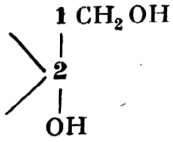
α-d-glucofuranoza



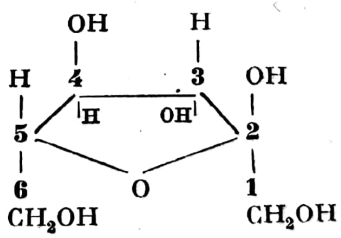
β-d-glucofuranoza



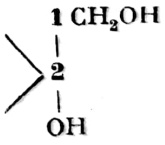
α-fructopiranoza



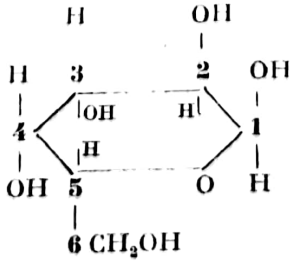
β-fructopiranoza



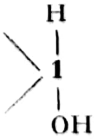
α-fructofuranoza



β-fructofuranoza

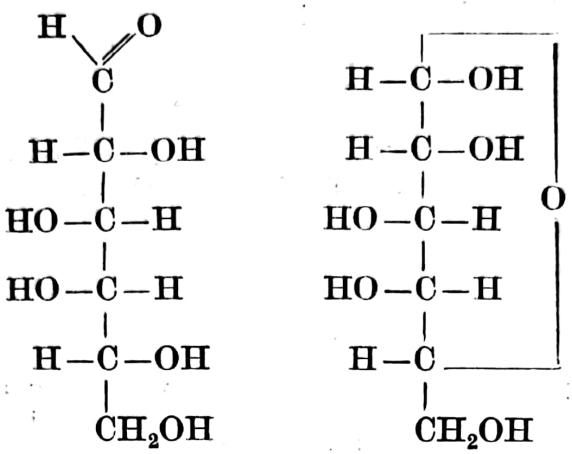


α-galactoza piranozică



β-galactoza piranozică

d (+)-**Galactoza.** $C_6H_{12}O_6$. Este o aldohexoză. In soluție prezintă fenomenul mutarotației; formează cu fenilhidrazina o osazonă caracteristică. Nu se găsește liberă în natură, ci sub formă polimerizată; cu glucoza formează dizaharidul *lactoza;* sub formă de polizaharid are numele



d-galactoza α-d-galactopiranoza

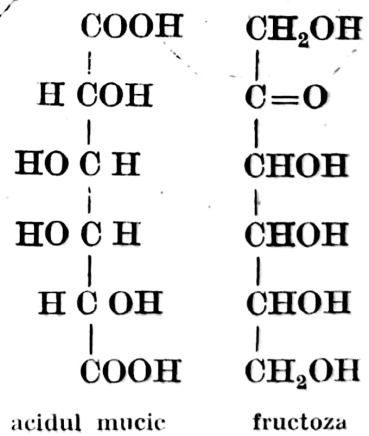
de *galactane* sau *galactozane.* Intră sub formă de galactozide în structura unor compuși azotați din creier, constituind *cerebrozidele.*

Prin reducere dă alcoolul *dulcita.*

Prin oxidare cu acid azotic dă întâi acidul galactonic, apoi *acidul bibazic,* numit acidul *mucic* (fig. 32). Deși conține 4 atomi de carbon asimetrici, acesta este optic inactiv din cauza simetriei moleculare constituind așa numita compensație internă.

Acidul mucic servește chiar la identificarea în laborator a galactozei. Este dextrogiră cu $[\alpha]_D^{20°} = 81°5$ și există, ca și glucoza și manoza, sub două forme ciclice piranozice, α și β.

Fig. 32. Cristale de acid mucic.



acidul mucic fructoza

d (−)-**Fructoza** sau **levuloza** este o **cetohexoză;** se găsește alături de glucoză sub formă liberă sau combinată cu glucoza sub forma dizaharidului important *zaharoza.*

După orânduirea sterică la carbonul 5 ar aparţine seriei *d*, roteşte însă planul luminii polarizate la stânga, este deci levogiră, de unde şi numele de levuloză. Este deci *d* (—) fructoză. Liberă, fructoza se găseşte sub formă piranozică (forma α şi β), intră însă în compoziţia di- şi polizaharidelor sub forma sa furanozică, de unde, fiind eliberată, revine la forma sa stabilă, piranozică.

Se găseşte în regnul vegetal în diverse combinaţii, de exemplu, în dizaharidul zaharoza împreună cu glucoza; în polizaharidul *inulina*, de unde este şi preparată. Se găseşte şi în organismul animal, uneori sub formă liberă după ingerare de multe fructe şi se poate elimina prin urină. Prin fermentaţia fructozei se obţin produse identice acelora rezultate din fermentaţia glucozei. Se diferenţiază de aldoze, respectiv de glucoză, cu ajutorul reacţiei Selivanov (cu rezorcina clorhidrică). Sub acţiunea HCl, fructoza se transformă în metiloxifurfurol, care se uneşte cu rezorcina dând un produs colorat în roşu-intens. Glucoza nu dă această reacţie şi niciuna din aldoze. Are deasemenea *hidrazone* diferite de ale glucozei, dar are ozazone identice. Pentru identificare se determină punctul de topire al ozazonei formate. In soluţie prezintă fenomenul mutarotaţiei.

l (—)-**Sorboza** se formează prin oxidarea hexaalcoolului sorbitolul sub acţiunea bacteriilor specifice numite „bacteria sorbozei". Din *l* (—)-sorboza se prepară acidul ascorbic (vitamina C), de unde s'a dedus că această vitamină ar fi înrudită cu zaharurile.

OZIDELE

A doua grupă mare din clasa glucidelor, ozidele, se împarte în *holozide* şi *heterozide*.

HOLOZIDELE

Se împart în *oligozaharide* şi *polizaharide*, în raport cu numărul monozaharidelor din moleculă.

Oligozaharidele

Oligozaharidele cuprind zaharurile formate din 2—5 monozaharide. Legătura dintre monozaharide se face prin hidroxilul glicozidic sau hidroxilul semiacetalic, şi anume, prin eliminarea unei molecule de apă între oxidrilul semiacetalic al unui C dintr'un monozaharid şi oxidrilul semiacetalic sau alcoolic al altui monozaharid. In primul caz, legătura este deci dicarbonilică, în al doilea caz monocarbonilică. In primul caz, ambele grupări carbonilice fiind blocate, compusul rezultat nu va da reacţiile caracteristice acestei grupări — nu vor fi reductoare (reacţia Fehling negativă); în al doilea caz, fiind în moleculă o grupare carbonilică liberă, molecula va da reacţiile caracteristice (reacţia Fehling va fi pozitivă). Tipul de legătură monocarbonilică se mai numeşte şi tip maltozic, după dizaharidul maltoza la care se găseşte această legătură; tipul de legătură dicarbonilică se mai numeşte şi tip trehalozic, după legătura existentă la un dizaharid vegetal, *trehaloza*.

Monozaharidele din molecula oligozaharidelor pot avea ciclu piranozic sau ciclu furanozic, α sau β.

Scanned with OKEN Scanner

Dizaharidele

Au formula brută $C_{12}H_{22}O_{11}$.

Vom descrie pe cele mai importante.

Zaharoza $C_{12}H_{22}O_{11}$ este dizaharidul cel mai răspândit în natură. Se găseşte în multe plante (trestie de zahăr, sfeclă, etc.). E uşor solubilă în apă, greu solubilă în alcool. Prin hidroliză se desface într'o moleculă de glucoză şi una de fructoză. Glucoza este aici sub formă de α-glucoză piranozică, iar fructoza sub formă de β-fructoză furanozică. Este un α-glicozid β-fructozid.

Legătura dintre aceste două molecule este dicarbonilică. Se face între carbonul aldehidic al glucozei şi cel carbonilic al fructozei, deci nu are nicio grupare carbonilică semiacetilică liberă. Aşa se explică dece zaharoza nu are proprietăţi reductoare, nu reduce licoarea Fehling, nu dă ozazone.

Nu este reductoare decât după desfacerea ei prin hidroliză în monozaharidele corespunzătoare, glucoza şi fructoza. Hidrolizează, desfăcându-se în aceste monozaharide sub acţiunea acizilor sau sub acţiunea unei enzime specifice, numită *zaharaza* sau *invertaza*. Această din urmă enzimă există în intestin unde scindează zaharoza în monozaharidele corespunzătoare, zaharurile neputând fi resorbite în organism decât sub formă de monozaharide. Zaharoza este optic activă $[\alpha]_D^{20} = +66°5$, roteşte planul de polarizaţie la *dreapta*, după hidroliză însă roteşte acest plan la *stânga*, de unde şi numele de „inversiune" dat acestei hidrolize care modifică sensul rotaţiei optice. Acest lucru se explică prin aceea că *d* (—) fructoza eliberată prin hidroliză roteşte mai intens planul de polarizare la stânga decât glucoza la dreapta.

Maltoza $C_{12}H_{22}O_{11}$ se scindează prin hidroliză în două molecule de glucoză. Este un glucozo-α-glicozid. Este puternic dextrogiră. Prezintă fenomenul mutarotaţiei.

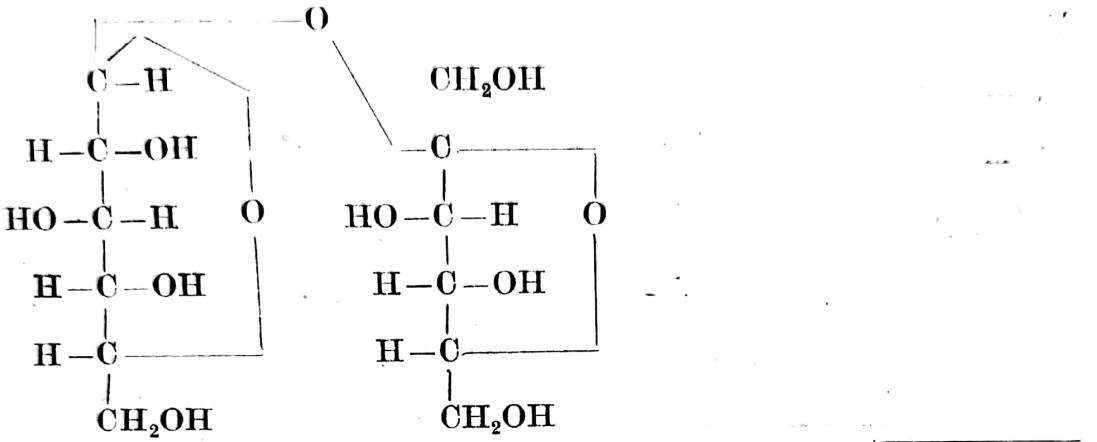
E formată din două molecule de glucoză legate monocarbonilic (C_1 carbonilic cu C_4 oxidrilic), deaceea păstrează proprietăţile reductoare şi dă ozazone. Se desface în componentele sale sub acţiunea hidrolitică a acizilor şi sub acţiunea unei enzime specifice, maltaza (găsită prima oară în extractul de malţ, de unde numele de maltoză). Maltoza se găseşte în multe plante; rezultă din degradarea fermentativă a amidonului şi glicogenului.

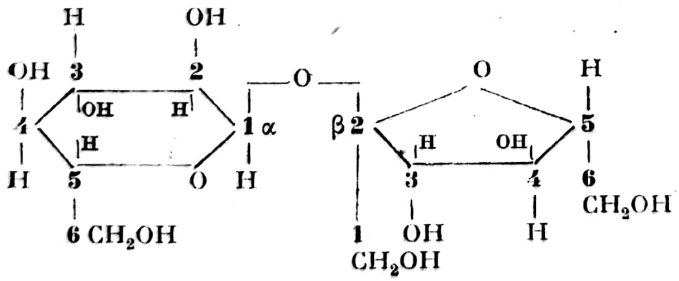
Lactoza $C_{12}H_{22}O_{11}$ — zahărul din lapte. Este dextrogiră, prezintă fenomenul mutarotaţiei. Prin hidroliză se scindează în o moleculă de glucoză şi una de galactoză. Este un gluco-β-galactozid rezultat prin legătura monocarbonilor între aceste două monozaharide. Legătura glicozidică se face prin carbonul *1* al galactozei şi *4* al glucozei, acesta păstrându-şi carbonul carbonilic liber, ceeace face ca lactoza să aibă proprietăţi reductoare, să dea ozazone, etc. Prin oxidare se obţine iniţial acidul zaharic (din molecula de glucoză) şi apoi acidul mucic din molecula de galactoză. Sub acţiunea enzimei specifice, lactaza din intestin, lactoza este scindată în cele două componente. In urina femeilor care alăptează se găseşte adesea un izomer al lactozei, allolactoza.

Celobioza $C_{12}H_{22}O_{11}$ — e formată, ca şi maltoza, din două molecule de glucoză, dar de β-glucoză. Este un glucozo-β-glicozid (legătura 1,4) şi nu un α-ozid ca maltoza.

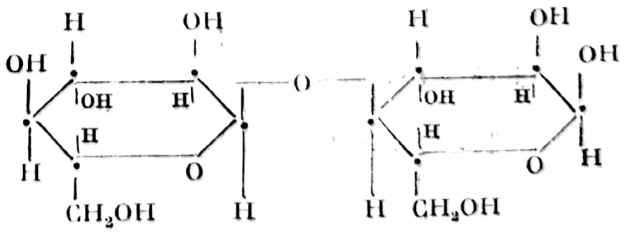
Monozaharidele sunt legate monocarbonilic, deaceea își păstrează proprietățile reductoare. Celobioza nu se găsește liberă în natură, intră în structura celulozei. E desfăcută în monozaharidele componente sub acțiunea unui complex enzimatic din migdalele amare, emulsina.

Dizaharide

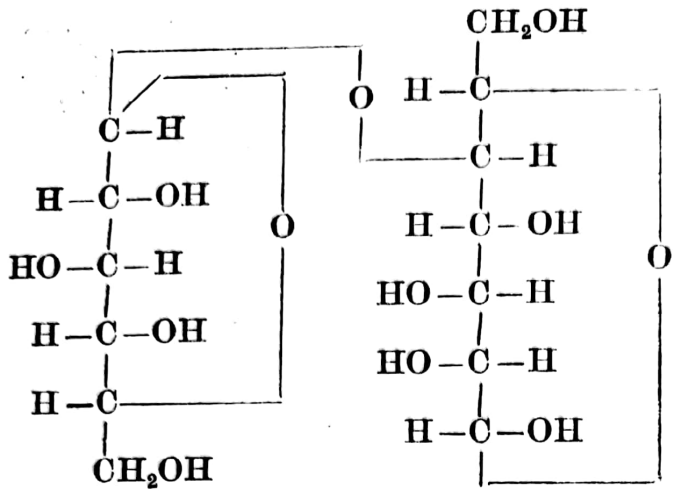


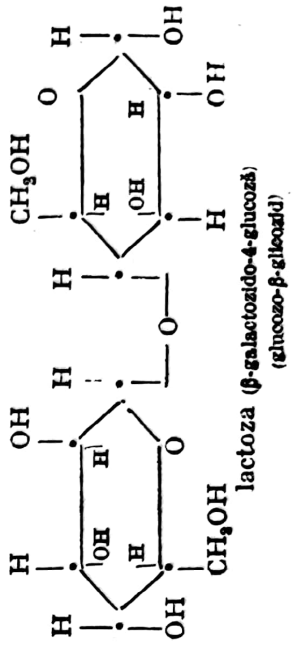


zaharoza α-glicozido-β-fructoză

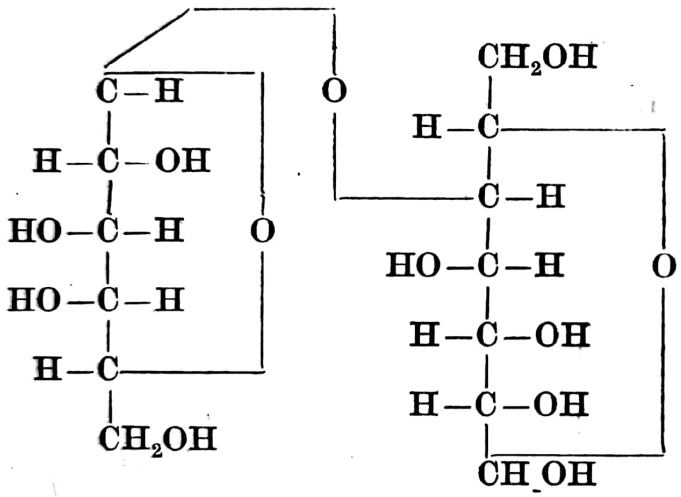


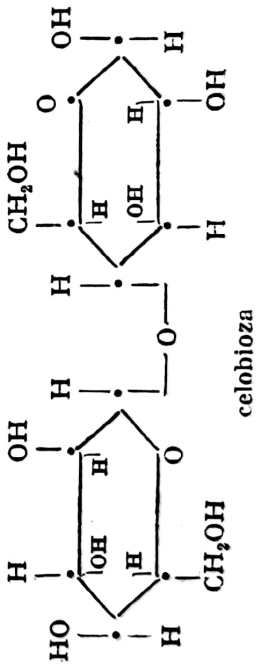
maltoza (d-glucozo-4-α-diglicozid)



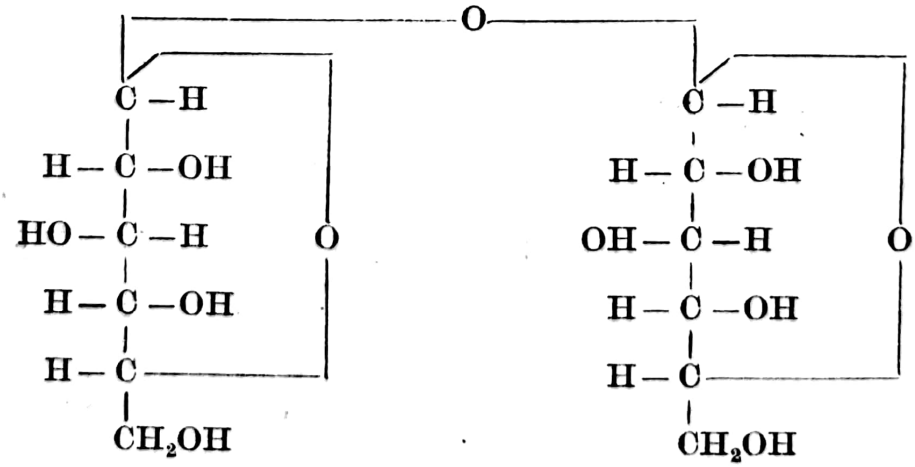


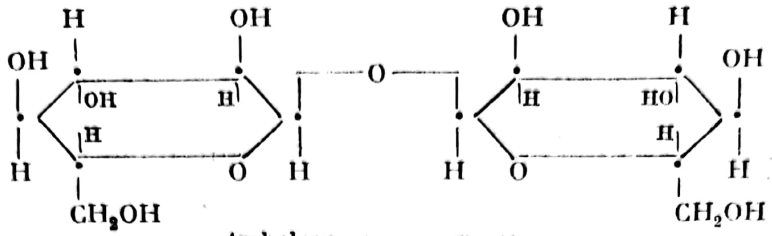
lactoza (β-galactozido-4-glucoză)
(glucozo-β-glicozid)





celobioza





trehaloza (glucozo-α-glicozid)

In rezumat, dizaharidele pot fi schematizate astfel :

Zaharoza	$-H_2O$ → glucoză + fructoză	nu e reductoare decât după hidroliză
Maltoza	$-H_2O$ → α-glucoză + α-glucoză	reductoare
Lactoza	$-H_2O$ → glucoză + galactoză	reductoare
Celobioza	$-H_2O$ → β-glucoză + β-glucoză	reductoare

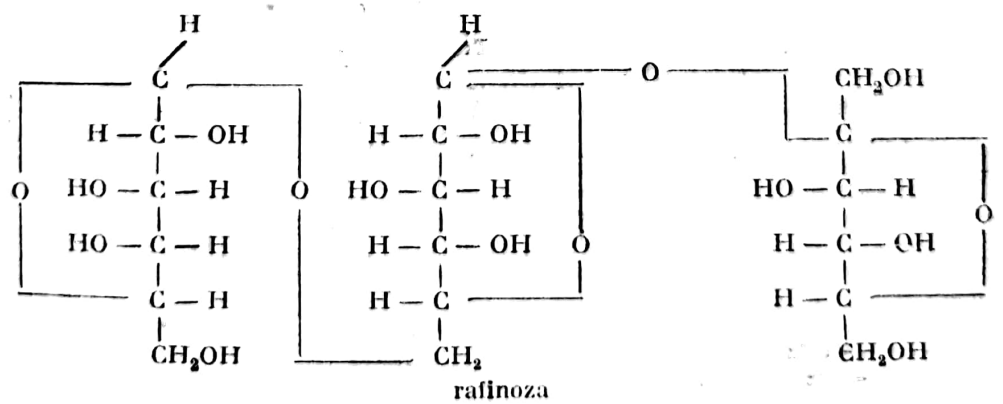
Se cunosc trei dizaharide din plante : *gentiobioza* (glucozo-β-glicozid cu legătura 1,6), *melibioza* (glucoza + 6 — α — galactozid) zahărul din glicozidul amigdalina şi *trehaloza,* obţinută din drojdie, care este un glucozo-α-glicozid cu legătura 1,1.

Trizaharide $C_{18}H_{32}O_{16}$.

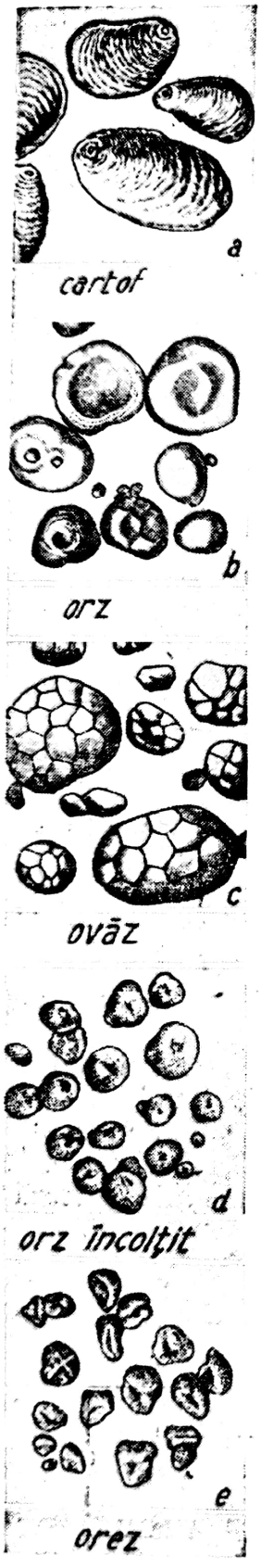
Mai importante sunt :

1. **gentianoza,** formată din două molecule de glucoză şi una de fructoză ; a fost izolată din rădăcinile de genţiană ;

2. **rafinoza** conţine o moleculă de glucoză, una de fructoză şi una de galactoză. Se găseşte în sfecla de zahăr, în sămânţa de bumbac. Prin hidroliză blândă se separă întâi fructoza şi dizaharidul *melibioza,* o galacto-glucoză izomeră cu lactoza. Prin hidroliză mai puternică se scindează toate trei componentele. O enzimă, rafinaza, prezentă în unele bacterii, o hidrolizează deasemenea în componentele sale :



rafinoza



a = cartof b = orz c = ovăz
d = orz încolțit e = orez

Fig. 33. Granule de amidon de diverse surse

Polizaharidele

Polizaharidele sunt compuşi formaţi dintr'un număr extrem de mare de monozaharide legate glicozidic între ele. Rezultă din monozaharide prin eliminarea unei molecule de apă între moleculele lor şi stabilirea unei legături glicozidice între ele. Sunt deci anhidride ale monozaharidelor. Se elimină totdeauna atâtea molecule de apă câte monozaharide intră în structura polizaharidului, minus una. Au astfel formula generală : $(C_6H_{11}O_5)_n$, unde n are o valoare foarte mare, indicând de câte ori molecula monozaharidului se repetă în interiorul moleculei polizaharidului. Polizaharidele pot avea molecula extrem de mare, făcând astfel parte din clasa compuşilor macromoleculari, din clasa polimerilor înalţi. Structura macromoleculară a polizaharidelor le conferă proprietăţi coloidale. Se mai numesc deaceea şi coloizi ozogeni. Deşi sunt formate din monozaharide, s'a dovedit prin mijloace chimice şi enzimatice că *„unitatea structurală"* cea mai mică din molecula polizaharidului nu este monozaharidul, ci „dizaharidul".

Acest lucru a fost confirmat prin aplicarea *röntgenspectrografiei* la studiul moleculei acestor compuşi. Această metodă a dus la rezultate extrem de interesante în ceeace priveşte orânduirea atomilor în moleculă şi a moleculelor mai mici în structura moleculelor mai mari. Dacă se iradiază un compus cu raze Röntgen, acestea vor suferi o deviere când compusul iradiat are o structură în reţea, nodurile reţelei fiind constituite din atomi sau grupări de atomi. După poziţia interferenţelor razelor deviate se pot trage concluzii asupra distanţelor şi poziţiilor atomilor. Vom vedea că aplicarea acestei metode în studiul celulozei a dus la concluzia că unitatea structurală la acest compus nu este monozaharidul glucoza, ci dizaharidul maltoza.

Polizaharidele sunt componente de extremă importanţă biologică. Servesc organismului animal şi vegetal ca material plastic, substanţă de susţinere (având rolul de a conferi rezistenţă mecanică, de exemplu celuloza) sau ca substanţe de rezervă (amidonul, glicogenul, inulina).

Există polizaharide de origină animală şi de origină vegetală. Cel mai important polizaharid de origină animală este glicogenul. De origină vegetală sunt *amidonul, celuloza, inulina, pentozanele,* etc. In organism sunt metabolizate deabia după scindarea lor hidrolitică până

la monozaharide, fenomen care are loc sub acțiunea catalitică a enzimelor specifice.

Vom descrie polizaharidele mai importante.

Amidonul. Amidonul este cea mai importantă rezervă glucidică din plante și este sursa cea mai importantă de zaharuri pentru animale și oameni. Se formează în plante prin polimerizarea glucozei rezultate din CO_2 și H_2O în cursul sintezei clorofiliene. In sinteza clorofiliană Mg ar avea un rol de bază. Amidonul se depune sub forma unor granule de mărime și aspect caracteristic fiecărei specii vegetale (porumb, grâu, orez, cartofi). Acest lucru permite diferențierea lor (fig. 33).

Valoarea alimentară a acestor specii depinde de cantitatea de amidon pe care o conțin. Grăunțele de amidon nu au o structură omogenă; sunt formate din straturi concentrice în jurul unui nucleu întunecat și prezintă fenomenul birefringenței. Amidonul de diverse proveniențe prezintă diferențe structurale și de comportare.

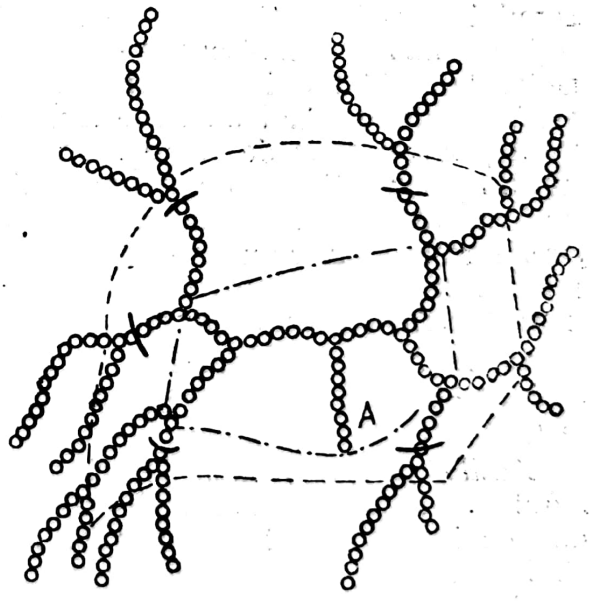
Amidonul nativ este aproape insolubil în apă rece. Amidonul solubil (Amylum solubile) este un produs de degradare a amidonului. Prin încălzirea amidonului în soluție se formează un gel coloidal omogen, așa numita „cocă" sau clei de amidon, a cărei temperatură de formare este caracteristică pentru fiecare specie de amidon.

Amidonul dă cu iodul o colorație albastră caracteristică; ea dispare la cald și reapare la rece. Colorația nu este datorită unei combinații chimice între iod și amidon, ci unei adsorbții a iodului sub formă moleculară la suprafața particulelor de amidon.

Structura amidonului. Are formula generală $(C_6H_{10}O_5)_n$. Greutatea moleculară variază cu origina sa între 77 000 — 170 000.

Amidonul are o structură macromoleculară. Este format din două componente distincte, amiloza și amilopectina, separate chiar spațial în structura amidonului. Raportul amiloză/amilopectină ar fi de 1 : 3.

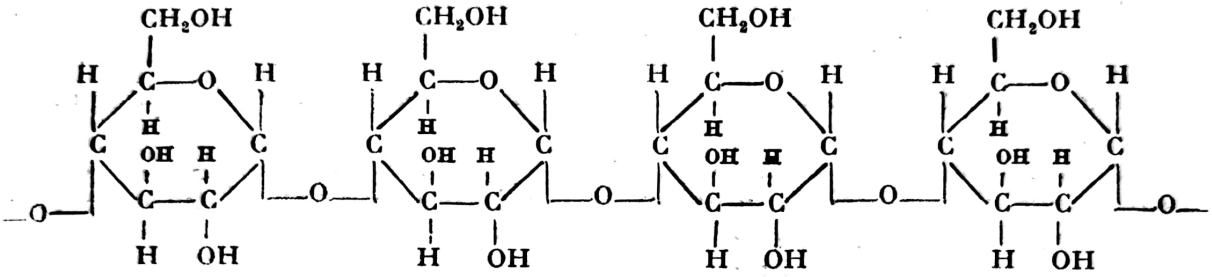
Amilopectina constitue învelișul exterior, amiloza e în interiorul bobului. Amilopectina e în proporție de 80% și conține P, o substanță azotată, acizi grași, urme de cationi (Ca^{++}, Na^{+}, K^{+}, Mg^{++}) și acid silicic. P ar fi sub forma de acid fosforic, care ar esterifica grupările hidroxil din molecula monozaharidelor. Prezența radicalului fosforic conferă amilopectinei caracterul unui coloid polar, care poate, prin adsorbție de apă, să formeze coca caracteristică.



0000 = unități de glucoză
A = grupări aldehidice terminale
-.-.-.- = terminațiile degradării inițiate de către β – amilază cu formare de dextrină I
— = Limita degradării produsă de α-glicozidază cu formare de dextrină II hidrolizată de β-amilază
---- = limitele atacului ulterior al β–amilazei cu formare de dextrină III

Fig. 34. Schema ramificată a amilopectinei

Amiloza este un *polihexozan* pur, nu formează cu apă coca, dă cu iodul o coloraţie albastră, pe când amilopectina dă o coloraţie roşie-brună-violetă. După cercetările mai noi, făcute cu ajutorul enzimelor, structura amilozei ar fi neramificată, ar avea un grad mic de polimerizare (300) şi o greutate moleculară între 10 000—100 000. A fost obţinută sub formă cristalizată. *Amilopectina* ar avea o structură ramificată, cu multe catene de glucoză, fiecare având aproximativ 35 unităţi de glucoză, grad mare de polimerizare (3000) şi o greutate moleculară mare (500 000). Ramificaţiile rezultă aici prin stabilirea legăturilor între C_1 şi C_6 (fig. 34). Prin hidroliză, sub acţiunea acizilor, amidonul scindează numai moleculele de *d*-glucoză sub forma piranozică, legate între ele la carbonii 1,4, prin legături α-glucozidice.



Structura unui fragment dintr'o catenă a amidonului

Prin hidroliză enzimatică sub acţiunea amilazei, amidonul este scindat până la dizaharidul maltoza, în care cele două molecule de glucoză sunt unite deasemenea α-glicozidic. Acest fapt arată că macromolecula amidonului este formată din molecule de maltoză legate α-glicozidic. Sub acţiunea maltazei, maltoza se desface în două molecule de glucoză. Macromolecula amidonului are o structură ramificată. Hidroliza acidă sau enzimatică a amidonului nu duce direct la maltoză, respectiv la glucoză, ci trece printr'o serie de etape intermediare în care se obţin oligozaharide cu un număr mai mic de monozaharide, aşa numitele *dextrine*. Dextrinele sunt substanţe solubile în apă, care nu formează coca, optic active, dextrogire, formate dintr'un număr variabil de molecule de glucoză. Au proprietăţi reductoare spre deosebire de amidon. Se disting amilodextrine, eritrodextrine, acrodextrine.

Degradarea amidonului s'ar petrece astfel:
amidon → amilodextrine → eritrodextrine → acrodextrine → maltoză → → glucoză.

Amilodextrinele sunt dextrinele cu moleculă mai mare; dau cu iodul o coloraţie albastră. *Eritrodextrinele* sunt cele imediat mai mici, dau cu iodul o coloraţie roşie. *Acrodextrinele* nu dau nicio coloraţie cu iodul.

Hidroliza enzimatică a amidonului se face sub acţiunea amilazelor: diastazele sau amilazele (salivară, pancreatică) din organismul animal, amilazele bacteriene, etc. până la maltoză şi sub acţiunea maltazei până la glucoză. Se distinge o α-dextrinogen-amilază şi o zaharogen-amilază. Există în *Bacillus macerans* o enzimă care produce o degradare specială a amidonului, îl lichefiază şi duce la formare de dextrine cristalizate cu structură ciclică, dextrină α şi β: prima e o pentazaharidă şi a doua o

hexazaharidă. S'a preparat prin sinteză sub acțiunea unor enzime musculare un amidon pornind dela glucoză și fosfat. Acest amidon sintetic are analogie cu amiloza.

Glicogenul. Este amidonul animal. A fost izolat prima oară din ficat de Claude Bernard (1855). Are ca și amidonul formula generală $(C_6H_{10}O_5)_n$. Se găsește în celulele tuturor organelor, mușchi, creier, nervi. Este forma de rezervă a glucidelor din organismul animal. Seamănă în special cu amilopectina. Se prezintă sub forma unei pulberi albe. Se disolvă în apă, dând o soluție coloidală opalescentă; este insolubil în alcool. Cu iodul se colorează în brun-castaniu. Se crede că diferențele de colorabilitate cu iodul depind de extensia catenelor ramificate — culoarea albastră fiind dată de catene slab ramificate, cea brună-roșie de catene foarte ramificate.

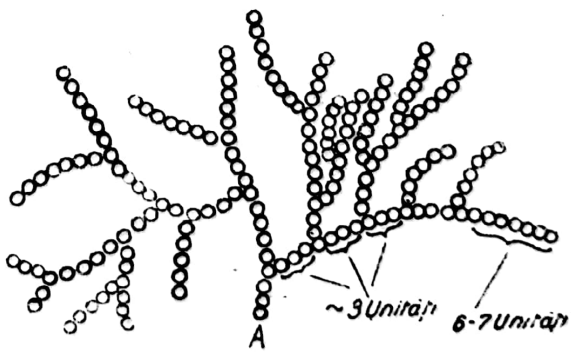
Moleculele de glucoză sunt legate α-1-4-glicozidic, în ramificațiile laterale, 1-6-glicozidic. Ca și amidonul, conține acid fosforic, chiar în cantitate mai mare decât acesta. Prin hidroliză acidă sau sub acțiunea amilazei se desface în molecule de glucoză; prin hidroliză enzimatică (maltaza), în maltoză. Are un mare grad de polimerizare, nu reduce soluția Fehling, e optic activ dextrogir. Nu are o structură liniară, ci una sferoidă, e un sferocoloid format din catene scurte de câte 8—12 molecule de glucoză (fig. 35). Glicogenul are în organismul animal același rol ca și amidonul în cel vegetal, constituind rezerva de zaharuri. Glucidele din alimentație sunt toate transformate în monozaharide și apoi depozitate sub formă de glicogen în ficat și mușchi, ficatul fiind depozitul central. La omul adult se pot depozita 100 g glicogen. Din acestea, organismul își ia pe cale sanguină glucidele necesare, pe măsura necesităților sale. Greutatea moleculară a glicogenului ar fi între 1 000 000—4 000 000.

Celuloza $(C_6H_{10}O_5)_n$. Are, ca și amidonul și glicogenul, formula generală $(C_6H_{10}O_5)_n$. Este substanța de susținere a țesuturilor vegetale. Nu este atacată de sucurile digestive ale omului, deaceea nu are importanță alimentară. Poate fi distrusă de microorganisme: bacterii și ciuperci. Se găsește în vegetale sub formă de fibre; cea mai pură e în fibrele de bumbac, unde există sub formă liberă 99,8%.

Structura celulozei. 1. Prin hidroliză cu HCl și în general cu acizi se obține un randament aproape cantitativ de glucoză (99,8%). E o anhidridă a glucozei, așa cum indică și formula sa $(C_6H_{10}O_5)_n$.

2. Prin acetilare sau nitrare se pun în evidență trei grupări oxidrilice libere (formare de esteri). Poziția lor a fost identificată prin metilare cu formare de trimetilglucoză la carbonii 2, 3 și 6. Deci, carbonii 1, 4 și 5 din molecula glucozei sunt blocați și deci prin aceștia se fac legăturile între diversele molecule de glucoză legate glicozidic, fie prin carbonii 1,5, fie prin carbonii 1,4. Ar conține 200 — 2 000 unități de glucoză.

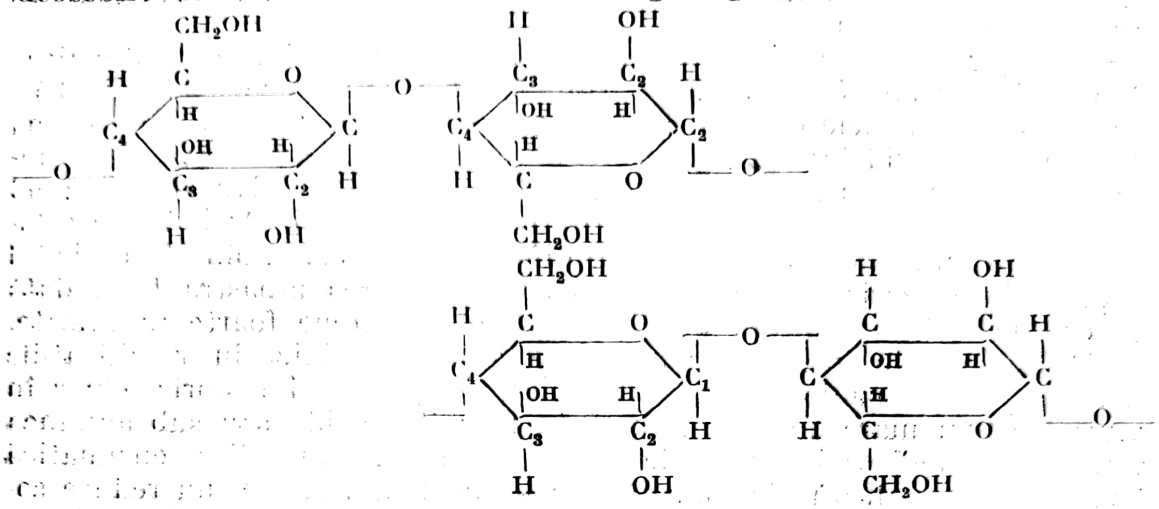
3. Prin hidroliză cu anhidridă acetică (hidroliză acetilată) se obține dizaharidul



O = unități de glucoză A = terminația aldehidică a lanțului

Fig. 35. Structura glicogenului

celobioza (dizaharid format din două molecule de β-glucopiranoză), spre deosebire de amidon care e format din glucopiranoză. Dizaharidul celo-



Fragment din molecula celulozei

bioză e cea mai mică unitate structurală în molecula celulozei. Analiza ei cu raze X pune în evidență o structură cristalină, în care fiecare lanț de molecule este paralel cu alt lanț de molecule, fixate între ele lateral prin valențe secundare sau legături de hidrogen între grupările oxidrilice opuse. Se formează astfel agregate de catene lungi, paralele cu axa fibrei. Totuși, se admite că structura celulozei este atât cristalină, cât și amorfă; are arii cristaline și amorfe. Fibra celulozică e privită astfel ca un sistem format din două faze, din același material chimic, dar combinat din două tipuri de agregate fizice. Analiza cu raze X indică existența unei regiuni cristaline, în care catena moleculară e presupusă a fi orânduită strict paralel, și a unei regiuni amorfe, în care catenele sunt mai puțin paralele. Legăturile catenei sunt imaginate ca fiind separate prin spațiile intermicelare ale regiunilor amorfe, spații care asigură pătrunderea lichidelor, coloranților, etc. în țesutul fibros. Unitatea elementară din molecula celulozei am spus că este celobioza, fapt dovedit deasemenea cu ajutorul razelor X; s'a găsit astfel că perioada de identitate a unității elementare este egală cu 10.28 Å, identică cu lungimea a doi radicali piranozici uniți între ei ca în molecula celobiozei (fig. 36). Orânduirea macromoleculelor filiforme este liniară și se manifestă în afară prin structura fibrilară a celulozei. Legăturile dintre macromolecule sunt legături de hidrogen, ceeace conferă celulozei o soliditate mare și o rezistență mecanică mare. Celuloza este insolubilă în toți

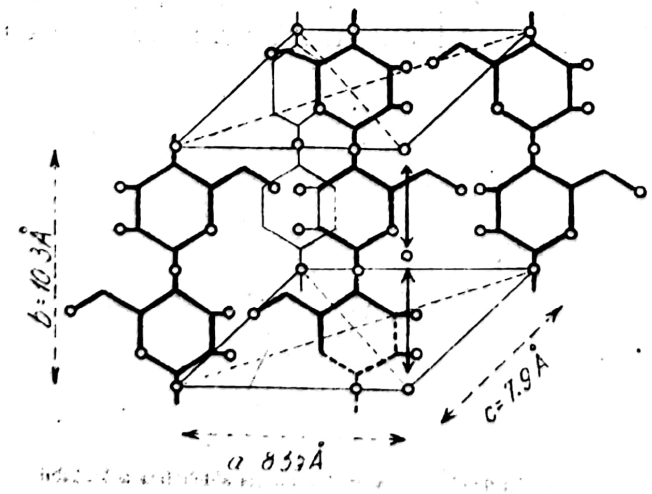
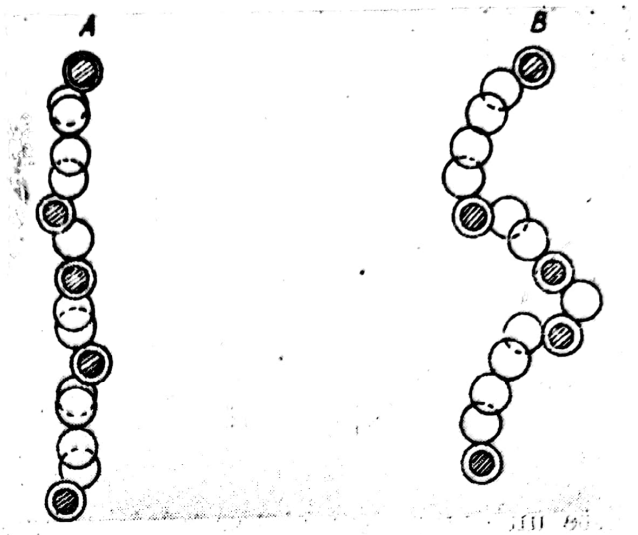


Fig. 36. Celula elementară de celuloză

solvenții cunoscuți. Disolvantul cel mai bun al celulozei este licoarea Schweitzer (SO_4Cu în amoniac dă o sare tetraaminocuprică). Insușirile mecanice ale celulozei scad pe măsură ce gradul de polimerizare scade. In general e de 3000 × gr. mol. 480 000, iar celulozele cu un grad de polimerizare sub 100 nu formează fibre. Enzima care degradează celuloza până la celobioză, e *celulaza*, iar aceea care o degradează până la glucoză, celobiaza. Aceste enzime nu se găsesc la om, ci la bacterii. Unele din acestea trăiesc simbiotic în canalul intestinal.



A = tăietură transversală a lanțului de valențe principale al celulozei
B = tăietură transversală a lanțului de valențe principale al amidonului.
In alb, atomii de carbon; *haşurat*, atomii de oxigen.

Fig. 37. Catena celulozei și a amidonului. Lanțuri glicozidice privite lateral

Din punctul de vedere al structurii macromoleculare, celuloza și amidonul aparțin coloizilor fibrilari sau liniari (fig. 37), iar glicogenul celor sferoizi sau globulari. Componenta elementară este la glicogen și amidon maltoza, la celuloză — celobioza.

Inulina este un polizaharid vegetal. Sub acțiunea unei enzime, inulaza, sau prin hidroliză acidă cu H_2SO_4, e scindată în *d*-fructofuranoză. Este deci un polimer al fructofuranozei, conținând aproximativ 30 de unități fructofuranozice, în moleculă. In structura inulinei intră așa dar o cetohexoză, *d*-fructoza, moleculele de glucoză (1, 2) fiind legate glicozidic.

Inulina este levogiră. Administrată intravenos este excretată prin urină, fapt folosit ca test al funcției renale.

Galactanele dau prin hidroliză galactoză (agar-agarul sau geloza este un galactan. Agar-agarul ar consta din *d*-galactoză legată glicozidic 1—3 și având o singură unitate *l*-galactoza în legătură 1—4 la capătul reductor al lanțului, care este esterificat în poziția 6 cu acid sulfuric).

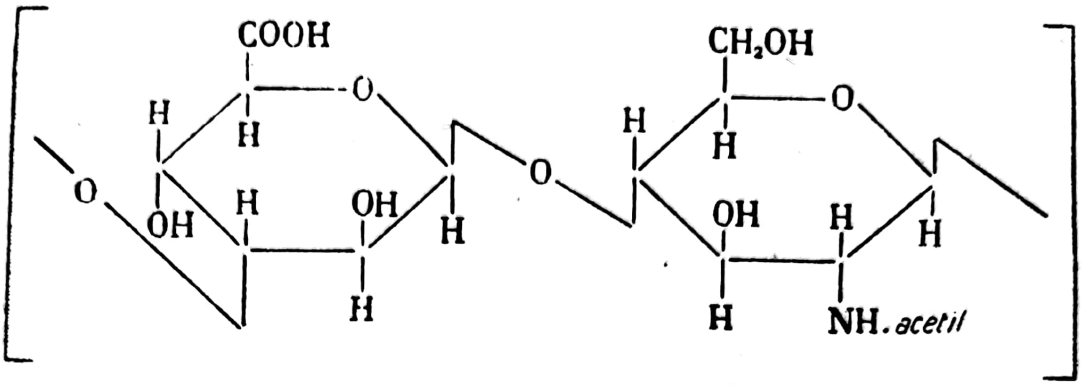
Arabanele dau prin hidroliză arabinoza (e o componentă importantă a gumei arabice, a gumelor vegetale, a materiilor pectice).

Xilanele sunt formate din xilopiranoze; împreună cu arabanele intră în compoziția substanțelor pectice sau *pectinelor* care sunt deci polizaharide mixte, ce formează peretele celulelor din fructe; se imbibă cu apă, dând soluții mucilaginoase și geluri transparente (pelteaua de fructe).

Chitina e un polizaharid interesant; eliberează prin hidroliză un aminozahar și acidul acetic — în proporții echimoleculare. Este substanța de susținere a insectelor și crustaceelor; este singurul polizaharid superior care conține azot. Prin hidroliză scindează molecule de acetilchitozamină.

Acidul hialuronic este un compus format din părți echimoleculare de acid glicuronic și N-acetilglucozamină, resturile de acetilglucozamină

fiind legate în proporţia 4. După date recente, formula acestui mucopolizaharid este următoarea :



Este un component al ţesutului conjunctiv. Acidul hialuronic este substratul enzimei cunoscute sub numele de factor de difuziune sau hialuronidază (mucopolizaharidază).

Se găseşte în substanţa fundamentală a ţesutului conjunctiv, în umoarea vitroasă, în lichidul sinovial, în cordonul ombilical, la om, în piele, în capsula unor bacterii (streptococ), în învelişul ovulului. Are o structură fibrilară şi conferă astfel ţesutului conjunctiv vîscozitatea sa caracteristică. Are rol mecanic, de apărare.

Imunopolizaharidele

Sunt polizaharide extrase din celula bacteriană şi sunt specifice fiecărei specii bacteriene şi fiecărui tip bacterian. Aceste polizaharide reacţionează specific cu serurile animalelor imunizate împotriva bacteriilor din care a fost extras polizaharidul (dau reacţii de floculare, de precipitare cu aceste seruri). Sunt asociate, la bacteriile Gram negative în special, cu o componentă lipidică şi cu una peptidică şi sub forma acestui complex, inoculate la animale, au proprietăţi imunizante, adică produc anticorpi care apără organismul împotriva germenului din care s'au extras aceste componente. Sunt aşa numitele antigene glucido-lipido-peptidice. La germenii Gram (+) în general, polizaharidele acestea nu sunt asociate cu componente lipidice, ci se extrag ca atare. Sub această formă nu au în general caracter antigenic, ci numai caracter de haptenă, dau reacţiile specifice (floculare, precipitare, etc.) dar nu au caracter antigenic (nu imunizează). S'au extras polizaharide din aproape toţi microbii (b. tific, holeric, gonococ, meningococ, etc.).

Polizaharide specifice se găsesc deasemenea în globulele roşii ale indivizilor din grupele sanguine A, B, AB şi O.

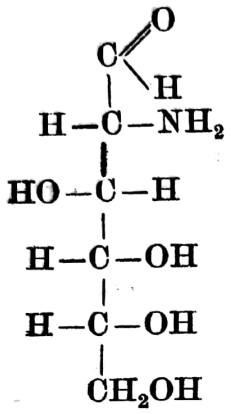
Derivaţi ai glucidelor

Aminozaharurile sunt zaharuri care conţin grupări aminice; ele rezultă din zaharuri prin înlocuirea grupării hidroxilice vecine grupării carbonilice cu o grupare aminică. Cele mai interesante sunt *chitosamina* şi *condrosamina*, care am văzut că intră în structura polizaharidului chitina.

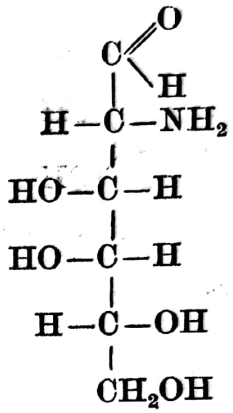
Chitosamina este o amino-*d*-glucoză sau o amino-*d*-manoză. Chitosamina intră în structura multor proteide, ca de exemplu mucina din salivă.

Ea face parte şi din structura acidului mucoitinsulfuric, o componentă a diverselor ţesuturi.

Condrosamina este un izomer al manozosaminei; conţine, în loc de glucoză sau manoză, galactoză. Este deci un aminoderivat al galactozei, o galactozamină. Intră în compoziţia acidului condroitinsulfuric, care intră în structura cartilajelor şi a unor ţesuturi.



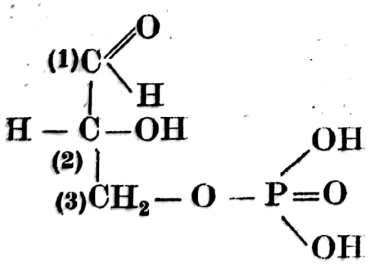
d-chitosamina



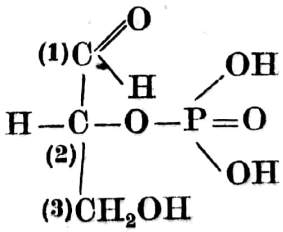
condrosamina

Esterii fosforici ai zaharurilor sunt extrem de importanţi din punct de vedere biologic. Sunt esteri ai acidului fosforic cu zaharurile. Ei se formează intermediar în cursul degradării glucidelor în muşchi şi în cursul fermentaţiei alcoolice sub acţiunea enzimelor specifice, *fosfatazele*. Esterii care apar în cursul metabolismului glucidelor sunt:

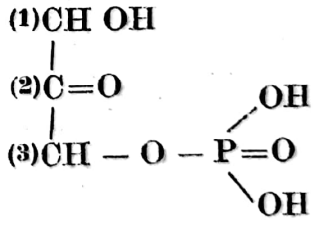
esterul *3-d-glicerinfosforic*, *2-d-glicerinfosforic* şi *dioxiacetonfosforic*



acid 3-d-glicerinfosforic



acid 2-d-glicerinfosforic

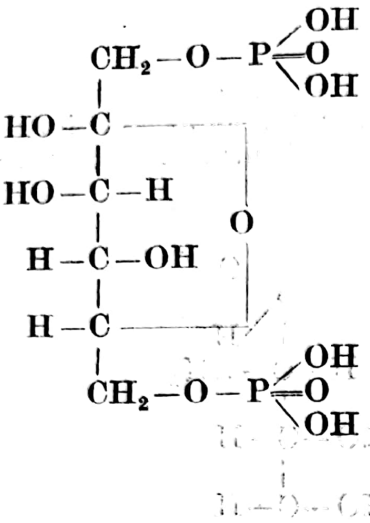


acid dioxiacetonfosforic

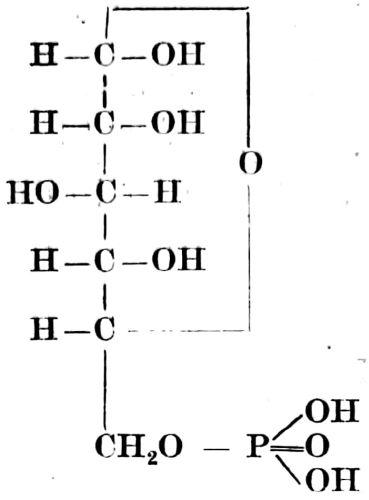
Apoi esterii hexozofosforici, şi anume:

esterul fructozo-1,6-difosforic, descoperit de Harden Young în fermentaţia alcoolică; esterul hexozo-6-monofosforic, numit de Embden şi lactacidogen.

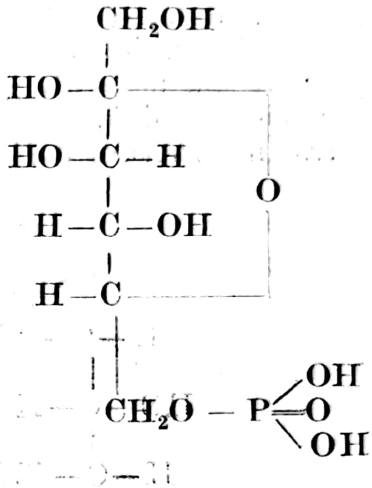
Vom vedea rolul lor important la capitolul despre metabolismul glucidelor.



ester fructozo-1,5-fosforic



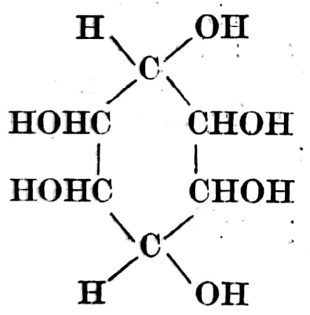
ester glucozo-6-fosforic



ester fructozo-6-fosforic

Ciclozele

Din cicloze face parte *inozita*, un compus carbociclic înrudit cu glucidele. E un derivat de benzen, un hexaoxihidrobenzen. Există aproape în toate organele animalelor, în special în mușchi. Nu este un zahar adevărat, dar dă unele reacții comune cu acestea, de exemplu formează furfurolul. In anumite cazuri de poliurie se elimină prin urină, de exemplu în cazurile de poliurie salină. In organismul animal are loc o sinteză a inozitei, probabil și din glucoză. La plante există sub formă de compuși importanți, ca de exemplu *fitina* (în semințele de *Bassica nigra*, descoperită de V. S. Palladin). Fitina e un compus format din inozită și acid fosforic—un ester hexafosforic al inozitei. Inozita e un factor de creștere, un hormon al creșterii la plante. Ar fi identic cu factorul Bios I și ar face astfel parte din grupa vitaminelor B.



inozita

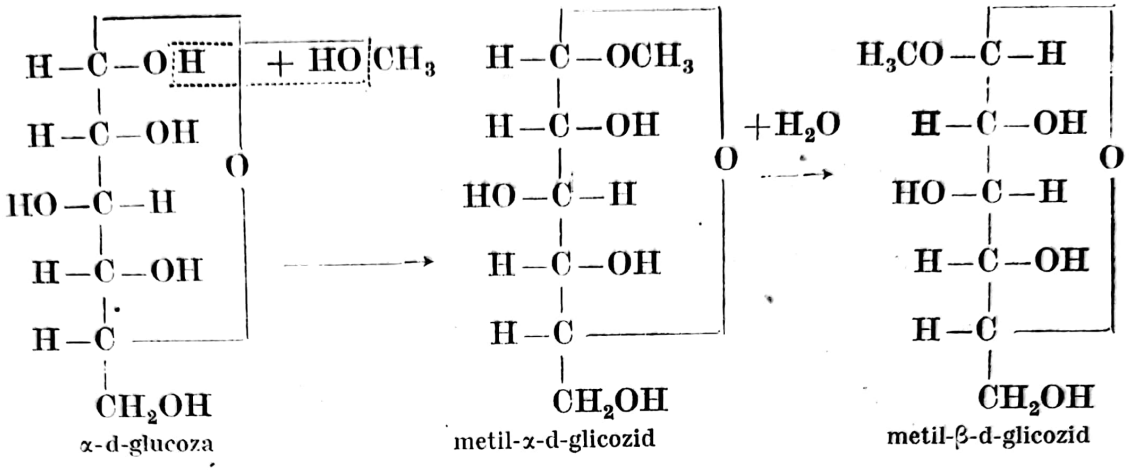
HETEROZIDELE SAU GLICOZIDELE

Heterozidele sau glicozidele sunt formate dintr'o componentă glucidică și una neglucidică numită *„aglicon"*; mulți din ei posedă proprietăți farmacodinamice. Legătura dintre moleculele de monozaharid și aglicon se face prin oxidrilul glicozidic dela C legat glicozidic.

Glicozidele pot exista sub forma izomerilor α și β.

Sub acțiunea enzimelor specifice, *glicozidazele*, se scindează monozaharidele; astfel α-glicozidaza scindează glicozidele, iar β-glicozidaza scindează β-glicozidele.

Un exemplu important de formaţie a glicozidelor este dat de reacţia dintre glucoză şi alcool metilic :



Deoarece în această reacţie intervine OH dela C_1 din molecula de glucoză, vor fi posibili doi izomeri corespunzând formelor α şi β ale glucozei.

Existenţa acestor doi izomeri în natură a fost de altfel un argument pentru formularea ciclică a glucidelor.

Aceşti doi izomeri se pot diferenţia cu ajutorul glicozidazelor specifice α şi β; maltoza scindează numai α-glicozidele, β-glicozidele fiind scindate numai de către emulsină.

Glicozidele nu posedă proprietăţi reductoare. Nu dau ozazone, au deci gruparea carbonilică blocată. Agliconul conferă fiecărui glicozid caracteristica specifică, deaceea glicozidele se clasifică după natura acestui aglicon în glicozide *alifatice, aromatice, heterociclice.* Multe glicozide din natură sunt importante.

Glicozidele fenolilor

Arbutina extrasă din pomul de pere este β-*d*-glicozidul hidrochinonei; *saligenina* e glicozidul alcoolului salicilic sau salicina. *Florizina* este un glicozid care conţine un radical acid oxifenilpropionic, un radical de floroglucină şi un radical glucoză.

Această substanţă introdusă în organism provoacă glicozurie : aşa numitul diabet florizinic.

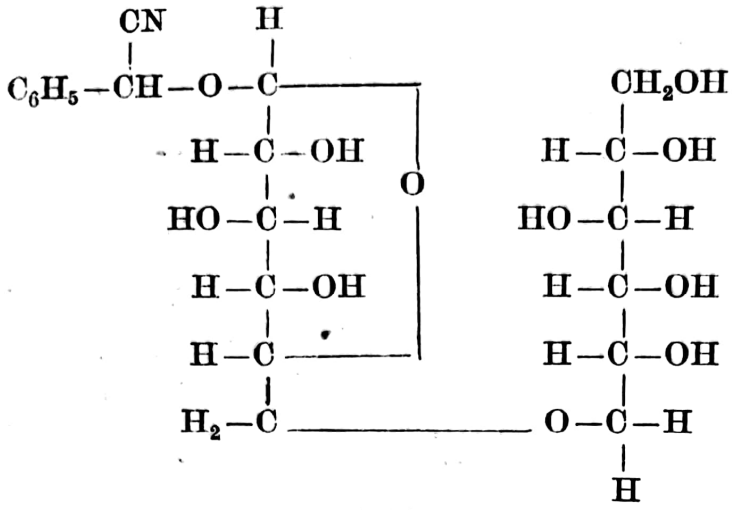
Există glicozide cu acţiune terapeutică : *adonina, strofantina* (administrate în bolile cardiace).

Glicozidele cianhidrinelor dau prin hidroliză enzimatică acid cianhidric, un zahar şi un aglicon, ca de exemplu *amigdalina* din migdalele amare, care sub acţiunea unui complex enzimatic, emulsina, conţinut tot în migdalele amare, se scindează în două molecule de glucoză, una de aldehidă benzoică şi una de acid cianhidric.

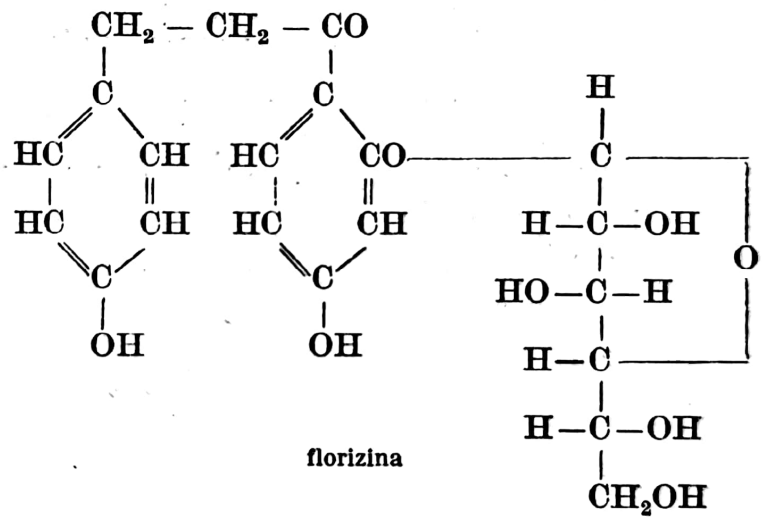
E de amintit că glicozidele pot fi de tipul α sau β, deci izomere între ele.

De exemplu : α-metilglicozidul conţine α-glucoză, β-metilglicozidul, β-glucoza. Aceşti doi izomeri se deosebesc şi prin gustul lor : α este dulce,

β este amărui. Primul este scindat de fermenţii drojdiei de bere, cel de al doilea de emulsină.



amigdalina



florizina

Partea III-a

LIPIDELE

Se înţelege în general sub numele de *lipide* o *clasă heterogenă de substanţe solubile în solvenţi organici* (eter, cloroform, benzen, tetraclorură de carbon) şi *insolubile în apă*. Din punct de vedere *chimic, lipidele sunt esteri ai alcoolilor cu acizii graşi cu greutate moleculară mare*. Conform acestei definiţii, lipidele se împart în :

1. *grăsimi neutre,* esteri ai *glicerolului* cu acizii graşi superiori ;
2. *ceride,* esteri ai *alcoolilor monovalenţi alifatici cu greutate moleculară mare* cu acizii graşi superiori ;
3. *steride,* esteri ai *alcoolilor monovalenţi aromatici* (steroli) cu acizii graşi superiori ;
4. *fosfolipide sau fosfatide,* care sunt tot esteri ai unui alcool cu acizii graşi superiori, dar conţin în molecula lor şi *acid fosforic,* precum şi o bază azotată ;

5. *cerebrozide*-esteri ai unui amino-alcool, *sfingozina*, cu acizii graşi superiori; conţin în moleculă şi un zahar, *galactoza*. Se mai numesc deaceea şi *galactolipide*.

Lipidele, fiind esteri ai alcoolilor cu acizii graşi superiori, pentru simplificare, studiul lor poate fi divizat în:

1. *studiul acizilor graşi care intră în constituţia lipidelor,*
2. *studiul alcoolilor care esterifică aceşti acizi graşi şi*
3. *studiul lipidelor rezultate din esterificarea acizilor cu alcoolii de mai sus.*

ACIZII GRAŞI CARE INTRĂ IN CONSTITUŢIA LIPIDELOR

Acizii graşi care intră în compoziţia grăsimilor naturale au următoarele caracteristici: 1) au cel puţin 4 atomi de carbon în moleculă, 2) sunt exclusiv acizi graşi cu *un număr pereche de carboni în moleculă*, 3) *sunt monoacizi*, catena lor putând fi *saturată* sau *nesaturată*, având una sau mai multe legături duble, *aciclică* sau *ciclică*, liniară sau, extrem de rar, ramificată, în care caz conţine un număr nepereche de carboni.

Acizii graşi saturaţi cu catenă aciclică, liniară

Au formula generală $C_nH_{2n}O_2$ sau $CH_3-(CH_2)_n\,COOH$ şi se deosebesc deci între ei prin numărul grupărilor CH_2 din moleculă. Termenul inferior din această serie, care poate intra în structura grăsimilor, este termenul cu *4C*, acidul butiric. Termenii superiori pot merge până la *26 de carboni* în moleculă. Primii termeni ai seriei, *acidul butiric* (C_4) şi *acidul caproic* (C_6), sunt lichizi la temperatura obişnuită.

Termenii următori sunt solizi, cristalizaţi, insolubili în apă, solubili în solvenţi organici (eter, benzen, cloroform). Acizii graşi saturaţi sunt substanţe stabile, greu oxidabile. In tabelul 5 sunt enumeraţi acizii graşi saturaţi cu catenă liniară.

Tabelul 5

Acizii graşi cu catenă liniară saturată

Acizii graşi saturaţi având un număr pereche de carboni: $C_nH_{2n}O_2$

Atomii de C din moleculă	Formula		Numele acidului
C_4	C_3H_7COOH	$CH_3(CH_2)_2COOH$	Acidul butiric
C_6	$C_5H_{11}COOH$	$CH_3(CH_2)_4COOH$	Acidul caproic
C_8	$C_7H_{15}COOH$	$CH_3(CH_2)_6COOH$	Acidul caprilic
C_{10}	$C_9H_{19}COOH$	$CH_3(CH_2)_8COOH$	Acidul capric
C_{12}	$C_{11}H_{23}COOH$	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$	Acidul lauric
C_{14}	$C_{13}H_{27}COOH$	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$	Acidul miristic
C_{16}	$C_{15}H_{31}COOH$	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	Acidul palmitic
C_{18}	$C_{17}H_{35}COOH$	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	Acidul stearic
C_{20}	$C_{19}H_{39}COOH$	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$	Acidul arahidic
C_{22}	$C_{21}H_{43}COOH$	$CH_3(CH_2)_{20}COOH$	Acidul behenic
C_{24}	$C_{23}H_{47}COOH$	$CH_3(CH_2)_{22}COOH$	Acidul lignoceric
C_{26}	$C_{25}H_{51}COOH$	$CH_3(CH_2)_{24}COOH$	Acidul cerotinic

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 38. Acidul palmitic

Acizii graşi saturaţi cu catenă ramificată

Sunt foarte puţin răspândiţi în natură. S'au găsit trei acizi de acest tip în bacilul tuberculos.

Acidul tuberculostearic ($C_{19}H_{38}O_2$), care este un acid metilostearic : $CH_3-(CH_2)_7-\underset{\displaystyle CH_3}{\underset{|}{CH}}-(CH_2)_8-COOH$, este un acid de acest tip şi se găseşte în ceara bacilului tuberculos.

Acizii graşi nesaturaţi cu catenă liniară

Conţin în moleculă una sau mai multe legături duble, fapt care le conferă proprietăţi speciale. Se mai numesc şi *acizi etenici*, iar după numărul legăturilor duble din moleculă pot fi *mono-*, *di-* sau *trietenici*. Poziţia legăturii duble este indicată printr'un număr stabilit în raport cu atomul de carbon carboxilic care e notat cu 1. Pot fixa la dubla legătură halogeni, ceeace îi diferenţiază de acizii graşi saturaţi şi permite identificarea lor. Pot fi oxidaţi cu ruperea catenei la locul legăturii duble şi astfel se permite determinarea gradului de nesaturare şi identificarea poziţiei acestei legături în catenă. Prin hidrogenare, în prezenţa unor catalizatori, se transformă în acizii graşi saturaţi corespunzători. Unii dintre acizii etenici sunt componenţi frecvenţi ai lipidelor (v. tabelul 6). Acizii graşi nesaturaţi au o serie de izomerii posibile, care depind atât de poziţia legăturii duble, cât şi de grupările în raport cu legătura dublă (izomeria cis-trans).

Tabelul 6

Acizii graşi nesaturaţi mai răspândiţi

Numele	Formula	Nr. legăturilor duble
Acid oleic (acid 9-octodecanoic)	$C_{18}H_{34}O_2$	1
Acid linolic (acid 9, 12-octodecanoic)	$C_{18}H_{32}O_2$	2
Acid linolenic (acid 12, 15-octodecanoic) . .	$C_{18}H_{30}O_2$	3
Acid arahidonic (acid 5, 8, 11, 14 eicosatetraconic)	$C_{20}H_{32}O_2$	4

Acizii monoetenici

Au formula generală $C_nH_{2n-2}O_2$. **Acidul oleic** este principalul reprezentant al clasei; el există în numeroase uleiuri şi grăsimi vegetale şi animale : $C_{18}H_{34}O_2$ sau $C_{17}H_{33}COOH$, $CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$. Este

lichid la temperatura ordinară. Are 18 atomi de carbon în moleculă. Prin hidrogenare dă acidul stearic.

Acidul nervonic conține 24 de atomi de carbon în moleculă și o legătură dublă $C_{24}H_{46}O_2$ sau $CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_{13}-COOH$.

Acizii dieteniei

Au formula generală $C_nH_{n-4}O_2$. Unul singur există în lipide, dar este foarte frecvent.

Acidul linoleic (sau linolic) conține 18 C, ca și acidul oleic, dar are două legături duble în moleculă. Este acid 9,12-octodecadienoic. Are formula generală $C_{18}H_{32}O_2$.

$$CH_3-(CH_2)_4-\overset{13}{CH}=\overset{12}{CH}-CH_2-\overset{10}{CH}=\overset{9}{CH}-(CH_2)_7-COOH$$

Acestui acid i se atribue proprietăți vitaminice (vitamina F).

Acizii trieteniei

Au formula generală $C_nH_{2n-6}O_2$. Se găsesc trei acizi de acest tip în lipide, toți au 18 C și se deosebesc între ei prin poziția legăturilor duble în catenă. Acești acizi sunt:

Acidul linolenic, oleostearic și γ-linoleic. La om se găsește numai acidul linolenic, a cărui formulă este următoarea:

$$CH_3-CH_2-\overset{16}{CH}=\overset{15}{CH}-CH_2-\overset{13}{CH}=\overset{12}{CH}-CH_2-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$$

Acid 9, 12, 15-octodecatrienoic.

Acizii tetraeteniei: $C_nH_{2n-8}O_2$.

Doi din ei se găsesc în lipide:

acidul arahidonic, având 20 C—($C_{19}H_{39}COOH$), se găsește în ficatul de porc și

acidul terapic cu 16 C, care se găsește în uleiul din ficatul morunului.

Acizii pentaeteniei: $C_nH_{2n-10}O_2$.

Se cunoaște un singur acid cu 22 C, care se întâlnește în uleiul peștilor, acidul *clupanodonic* $C_{22}H_{34}O_2$.

Oxiacizii

Sunt acizi grași cu funcții alcool în moleculă. Acești acizi, numiți și oxi- sau hidroxiacizi, pot fi saturați și eteniei cu una sau mai multe funcții alcool în moleculă.

Oxiacizi saturați

Acidul cerebronic $C_{24}H_{48}O_3$ cu formula: $CH_3-(CH_2)_{21}-CHOH-COOH$, intră în structura lipidului complex frenozina; *acidul sabinic* $C_{12}H_{24}O_3$ și acidul *juniperic* $C_{16}H_{32}O_3$ care intră în constituția cerurilor coniferelor.

Oxiacizi nesaturați

Acidul ricinoleic, care are o legătură dublă în catenă și 18 carboni; intră în structura uleiului de ricin $(CH_3)_2 - (CH_2)_5 - CHOH - CH_2 - CH=CH-(CH_2)_7-COOH$.

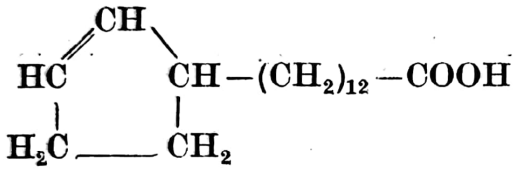
Acidul α-oxinervonic intră în structura unor lipide din creier $CH_3(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_{12}-CHOH-COOH$.

Acizi grași saturați cu două grupări OH

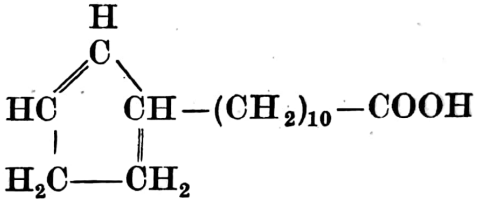
Acidul dihidrostearic $C_{18}H_{36}O_4$ din uleiul de ricin și *acidul lanoceric* $C_{30}H_{60}O_4$ din grăsimea de pe lâna oilor și din bumbac.

Acizi grași ciclici

Cunoscuți sunt numai doi: acidul *chaulmoogric* și *acidul hidnocarpic.* Au fost găsiți în uleiul de Chaulmoogra și unii esteri ai lor sunt utilizați în tratamentul leprei:



acidul chaulmoogric



acidul hidnocarpic

Săpunurile

Sărurile acizilor grași cu metalele se numesc săpunuri. Se cunosc săpunuri de Na, K, Pb, Ca, Mg, Be. Săpunurile cu Na și K sunt solubile în apă. Soluțiile lor apoase formează spuma caracteristică și au proprietăți coloidale. In soluții concentrate, moleculele se asociază în număr mare (dela câteva zeci la câteva mii, după concentrație), formând agregate moleculare numite micelii, cărora li se datorește caracterul coloidal al săpunurilor și care rezultă din unirea moleculelor prin ionii $R-COO^-$. Structura micelilor a fost cercetată cu ajutorul razelor X și s'a constatat că, în micelii, moleculele de săpun sunt orânduite ca într'un cristal. Grupările $-COONa$ formează planuri așezate față în față, iar grupările $-CH_3$ formează deasemenea planuri paralele. Forțele care unesc moleculele în micelii sunt forțe Van der Waals și forțe electrostatice între grupări COONa, care constitue planurile de carboxili. Grupările COONa din interiorul micelilor nu sunt disociate electrolitic. Cele exterioare disociază sub formă de COO^- și Na^+, stabilind legăturile cu moleculele dizolvantului, respectiv cu apa. Acestui fenomen de *solvatare* i se datorește solubilitatea săpunurilor în apă.

Săpunurile sunt substanțe capilaractive sau tensioactive, adică moleculele lor au tendința de a se acumula la suprafața de separație dintre soluție și mediul exterior. Ele sunt orânduite astfel: pe suprafața apei, carboxilul care are afinitate pentru apă e îndreptat înspre interiorul lichidului, iar restul radicalului acid, care nu are afinitate pentru apă, e îndreptat către exterior. Datorită acestei acumulări la suprafața lichi-

dului, tensiunea superficială a apei este scăzută, ceeace face ca aceşti compuşi să fie tensioactivi sau capilar-activi. Tendinţa săpunurilor de a forma spumă se explică tocmai pe baza acestei proprietăţi. Acţiunea de curăţire a săpunurilor se explică deasemenea prin proprietăţile lor capilaractive.

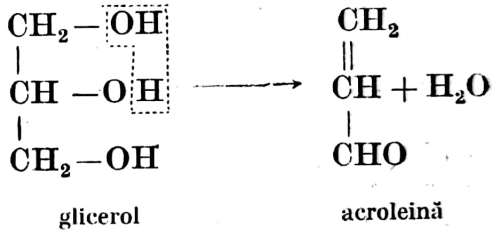
ALCOOLII CARE INTRĂ IN CONSTITUŢIA LIPIDELOR

Pot fi *aciclici, ciclici, azotaţi* sau *neazotaţi.*

Alcooli aciclici saturaţi

Cel mai răspândit alcool aciclic saturat care intră în structura lipidelor este

glicerolul, un **triol** : $CH_2OH-CHOH-CH_2OH$. Fiecare din funcţiile alcool poate fi esterificată cu un acid. Acizii care esterifică glicerolul pot fi identici între ei sau diferiţi. Identificarea glicerolului în structura lipidelor se face prin transformarea sa în acroleină, sub acţiunea deshidratanţilor, de exemplu cu bisulfit de potasiu ($KHSO_3$), produs care se identifică prin mirosul său caracteristic.

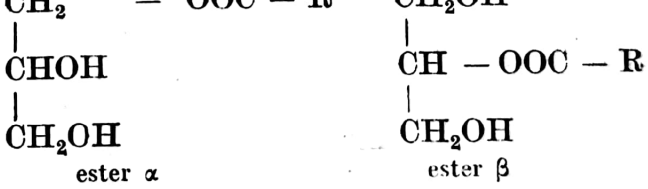


glicerol — acroleină

Monoesterii glicerolului pot exista sub două forme izomere α şi β. Monoesterii α se formează prin esterificarea funcţiei alcoolice primare din molecula glicerolului, monoesterii β prin esterificarea funcţiei de alcool secundar.

Monoesterii α au un C asimetric, acela al funcţiei de alcool secundar.

Glicerolul formează uşor în vid esteri cu acidul ortofosforic, aşa numiţii esteri glicerofosforici. Monoesterii fosforici sunt acei în care o moleculă de radical acid fosforic esterifică una din grupările alcoolice şi, după cum esterifică gruparea alcool primar sau secundar, se formează esterul glicerofosforic α sau β.



ester α — ester β

Alţi alcooli mai puţin importanţi ca glicerolul sunt :

alcoolul cetilic $C_{16}H_{33}OH$ este alcoolul primar corespunzător acidului palmitic $CH_3-(CH_2)_1-CH_2OH$; intră în structura a foarte puţine lipide (de exemplu, în ceridele din albul de balenă);

alcoolul cerilic $C_{26}H_{53}OH$ şi *alcoolul miricic* $C_{31}H_{63}OH$, care intră în structura cerii de albine.

Alcooli aciclici azotaţi

In grupa acestor alcooli mai importanţi sunt : colamina, colina şi sfingozina. Sunt baze azotate.

Colamina sau **aminoetanolul** $H_2N-CH_2-CH_2OH$ este un alcool-amină, are funcţie de alcool şi de amină, deci alcool primar, amină pri-

mară. Se poate obţine prin sinteză, prin acţiunea amoniacului asupra oxidului de etilen :

$$\underset{\text{oxid de etilen}}{\underset{\diagdown O \diagup}{CH_2-CH_2}} + NH_3 \longrightarrow \underset{\text{colamina}}{NH_2-CH_2-CH_2OH}$$

In soluţie, colamina fixează o moleculă de apă şi se hidratează, azotul devenind pentavalent

$$H_2N-CH_2-CH_2OH + HOH \longrightarrow H_3\equiv\underset{\underset{OH}{|}}{N}-CH_2-CH_2OH$$

OH fixat la azot fiind ionizabil, dă colaminei în soluţie caracter bazic. Colamina poate da două tipuri de compuşi, săruri cu acizii atunci când este înlocuit *OH* dela *N* cu radicalul acid, şi esteri, când reacţionează OH dela gruparea alcool primar :

$$\text{sarea : } \underset{\text{acetat de colamină}}{\begin{array}{l} NH_3-CH_2-CH_2OH \\ | \\ COO-CH_3. \end{array}} \text{ sau } \underset{\text{acetilcolamina}}{NH_2-CH_2-CH_2-COO-CH_3}, \text{ esterul.}$$

Colina este *trimetiloxietilhidroxid de amoniu*. Se poate socoti ca derivând din colamină în care s'au substituit la N pentavalent trei radicali CH_3 şi un OH. Are deci o funcţie OH cu caracter bazic fixat la N pentavalent şi o funcţie OH alcool primar. Este o bază puternică, care formează în soluţie săruri (cloruri, sulfiţi, acetaţi) prin funcţia OH bazic dela azot, iar prin gruparea OH alcool primar formează esteri cu acizii. Prin oxidarea colinei se obţin betaine, substanţe ce aparţin grupei derivaţilor metilaţi cuaternari ai aminoacizilor, substanţe care au caracter de *dipol* (au simultan încărcarea + şi —). Le vom întâlni la capitolul acizilor aminaţi.

$$\underset{\text{colină}}{\begin{array}{l} CH_3\diagdown \\ CH_3-N-CH_2-CH_2OH \\ CH_3\diagup \quad | \\ \qquad\quad OH \end{array}}$$

$$\underset{\text{colina}}{\begin{array}{l} CH_3\diagdown \quad OH \\ CH_3-N-CH_2-CH_2OH \\ CH_3\diagup \end{array}} \xrightarrow{+O_2} CH_3)_3\equiv\underset{\underset{\text{betaina}}{|}}{\overset{\overset{CH_2-COOH}{|}}{N}}-OH \xrightarrow{-H_2O} (CH_3)_3\equiv\underset{\underset{\text{betaina}}{|}}{\overset{\overset{CH_2-CO}{|}}{N}}-O$$

Colina se poate pune în evidenţă printr'o reacţie microchimică de mare sensibilitate, reacţia Florence. Sărurile de colină formează cu o soluţie concentrată de iod în iodură de potasiu cristale de iodhidrat de iodură de colină, foarte caracteristice. Această metodă e utilizată în medicina legală pentru identificarea spermei, care conţine derivaţi ai colinei ce sunt descompuşi fermentativ, eliberând colina. Colina are o importanţă biologică fundamentală. Vom vedea acest lucru la capitolul vitaminelor.

Sfingozina este un amino-alcool cu 18 C care conţine două funcţii alcoolice, o funcţie aminică şi o dublă legătură :

$$CH_3-(CH_2)_{12}-CH=CH-CH-CHOH-CH_2OH.$$
$$\quad\quad\quad

asimetrici apar la toți sterolii în aceeași configurație. Pentru denumirea izomerilor se ia drept criteriu fix metilul dela carbonul 10, față de care se determină poziția hidrogenului dela carbonul asimetric C . Acest hidrogen poate avea, în raport cu gruparea metilică dela carbonul 10, două poziții posibile, și anume o poziție deasupra planului moleculei, indicată printr'o linie plină (—), și o alta sub planul moleculei, desenată printr'o linie întreruptă (----). Acestor două poziții le corespund în realitate două forme izomere notate cu „trans" și „cis". Formei cu hidrogenul sub planul moleculei îi corespunde izomerul „trans" (----); această orânduire se găsește în hidrocarbura *„colestan"*, din care derivă alcoolul corespunzător, *colestanolul*. Forma cu hidrogenul deasupra planului moleculei este izomerul „cis" (—) care există în hidrocarbura *coprostan*, căruia îi corespunde alcoolul *coprostanol*.

Alcoolii colestanol și coprostanol rezultă din hidrocarburile corespunzătoare, colestanolul și coprostanolul, prin înlocuire la C_3 a unui H printr'un OH. Dar introducerea acestui OH la C_3 creează la rândul ei o nouă izomerie (un C asimetric în plus) tot în raport cu gruparea metil dela carbonul 10 (C_{10}); acestor izomeri li s'a dat numele de „epi" și „β". Izomerul „epi" are OH sub planul moleculei, iar „β" are OH deasupra planului moleculei. Izomeria β este de fapt o izomerie „cis", cea „epi" o izomerie „trans". Vor fi deci izomeri cis-trans, cis-cis, trans-trans, trans-cis.

S'au dat denumiri diferite acestor forme numai pentru a le putea deosebi între ele. Sterolii naturali sunt în general de tipul „trans" și β; de tipul cis este numai coprosterolul.

Vom analiza pe rând sterolii mai importanți, începând cu cel mai important sterol animal, cu colesterolul.

Sterolii animali

Colesterolul C_2-$H_{45}OH$. Este sterolul animal cel mai important din punct de vedere biologic. Este foarte răspândit în natură. A fost izolat prima oară din calculii biliari. Se găsește în stare liberă și sub formă de esteri ai acizilor grași (stearic, palmitic, oleic) în toate celulele și lichidele din organism. Conținutul în colesterol liber și esterificat variază dela organ la organ. Suprarenalele conțin cel mai mult colesterol, apoi țesutul nervos și pielea. In concrețiunile biliare poate atinge proporția de 90%. Există calculi biliari formați aproape numai din colesterol. Colesterolul poate fi sintetizat de celula animală; are rol în permeabilitatea celulară, are acțiune antitoxică și antihemolizantă. Are formula generală $C_2H_{5}OH$. Este un monoalcool secundar, lucru demonstrat prin transformarea sa în cetona corespunzătoare prin dehidrogenare. Rezultă din colestanol prin dehidrogenare la C_5—C_6, deci prin crearea în acest punct a unei legături duble. Caracteristicile formulei sale chimice sunt:

1. o grupare OH la carbonul 3,
2. o singură legătură dublă între carbonii 5 și 6 ai ciclului A și B,
3. o catenă laterală compusă din 8 carboni și fixată la carbonul 17 al ciclului pentagonal (D),
4. câte un radical metilic substituit la carbonii 10 și 13.

Coprosterolul $C_2H_{8}O$ este tot un sterol animal, dar este un produs de eliminare, ce se găsește numai în fecale — și nu o componentă a celulelor.

Scanned with OKEN Scanner

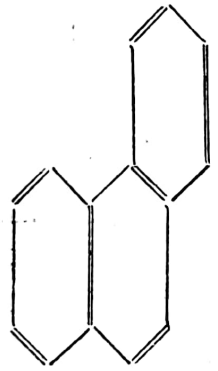
Rezultă din colesterol în urma acțiunii bacteriilor intestinale, printr'un proces de hidrogenare la legătura dublă unde se fixează 2H; deci, coprosterolul nu are dublă legătură în ciclu și are 2H mai mult decât colesterolul.

Sterolii vegetali

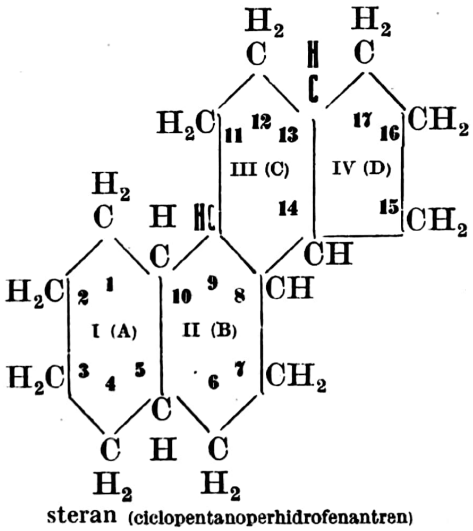
Stigmasterolul $C_{29}H_{8}O$ se găsește în embrionul bobului de grâu sub forma mai multor izomeri. Are ca și colesterolul o legătură dublă între C_5 și C_6, dar și o a doua legătură dublă între C_{22} și C_{23}, din catena laterală. Are deasemenea substituit în cateana laterală un radical etilic la C_{24}.

Ergosterolul $C_{28}H_{4}O$. Este un sterol din ciuperci, un micosterol. Este foarte important prin înrudirea sa cu vitamina D. Este provitamina vitaminei D_2.

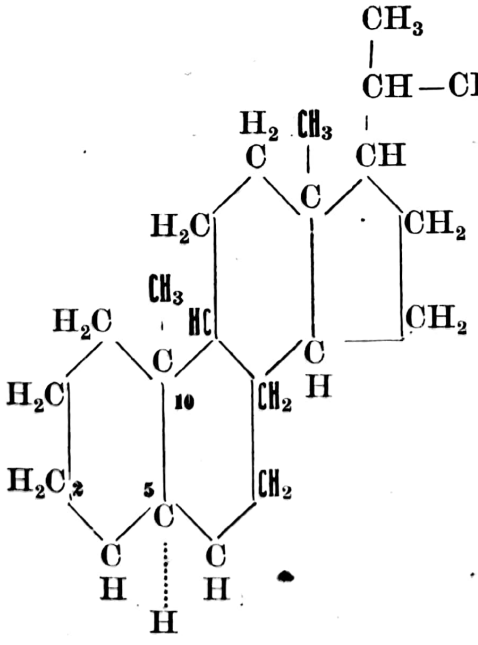
Alcooli ciclici care intră în structura sterolilor:



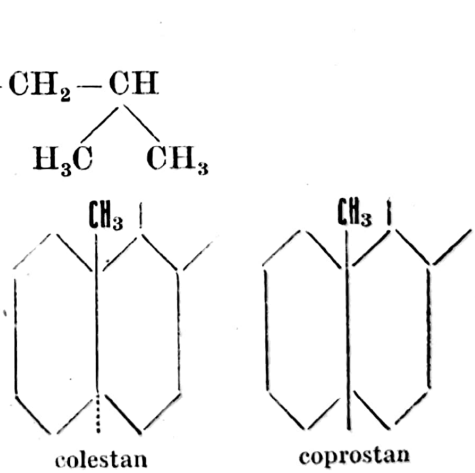
fenantren



steran (ciclopentanoperhidrofenantren)

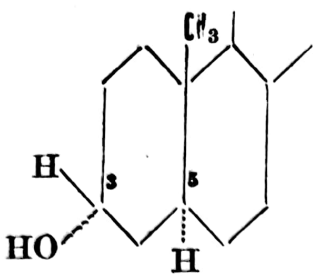


colestan

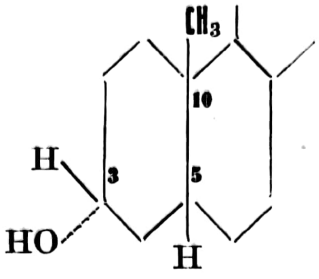


colestan

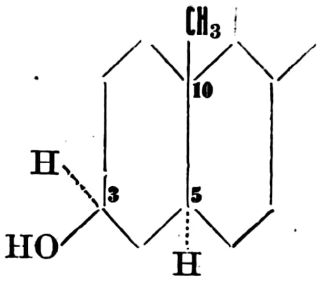
coprostan



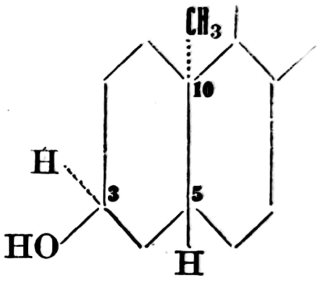
epi-colestanol



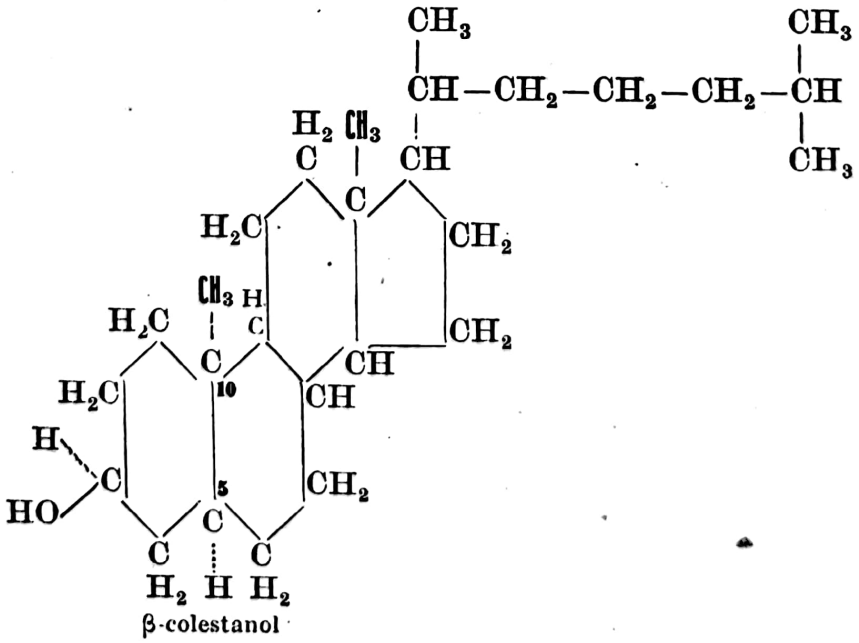
epi-coprostanol



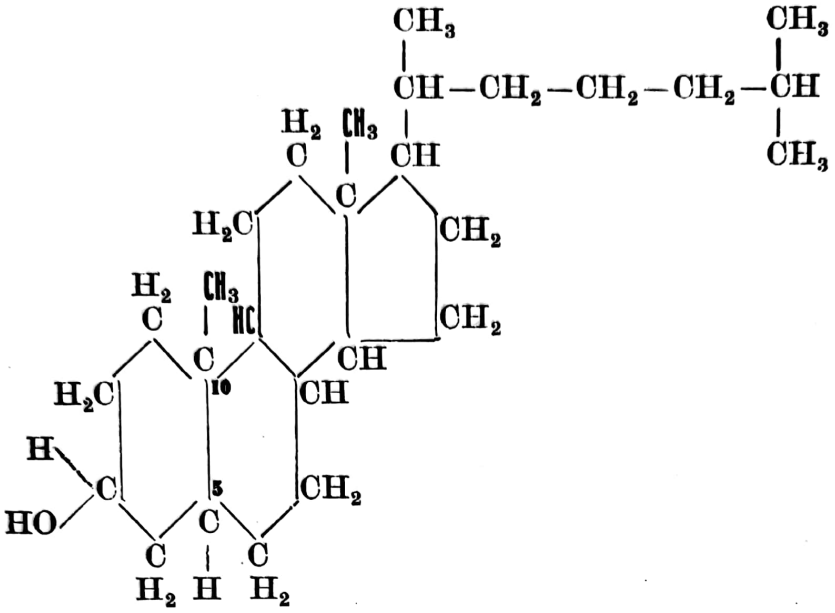
colestanol
(β colestanol) (transcis)



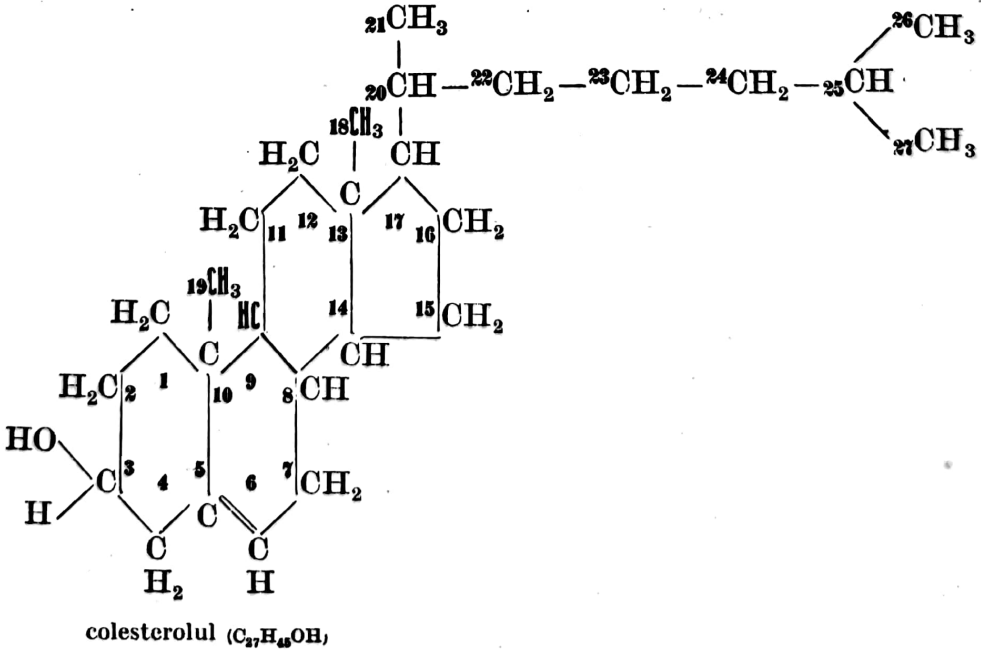
coprostanol
(β coprostanol) (cis-cis)



β-colestanol

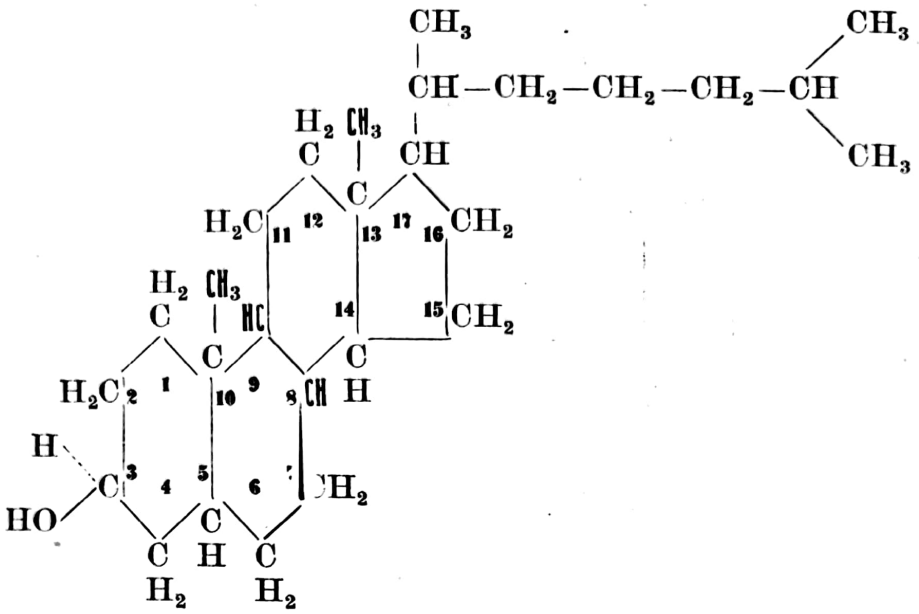


β-coprosterol

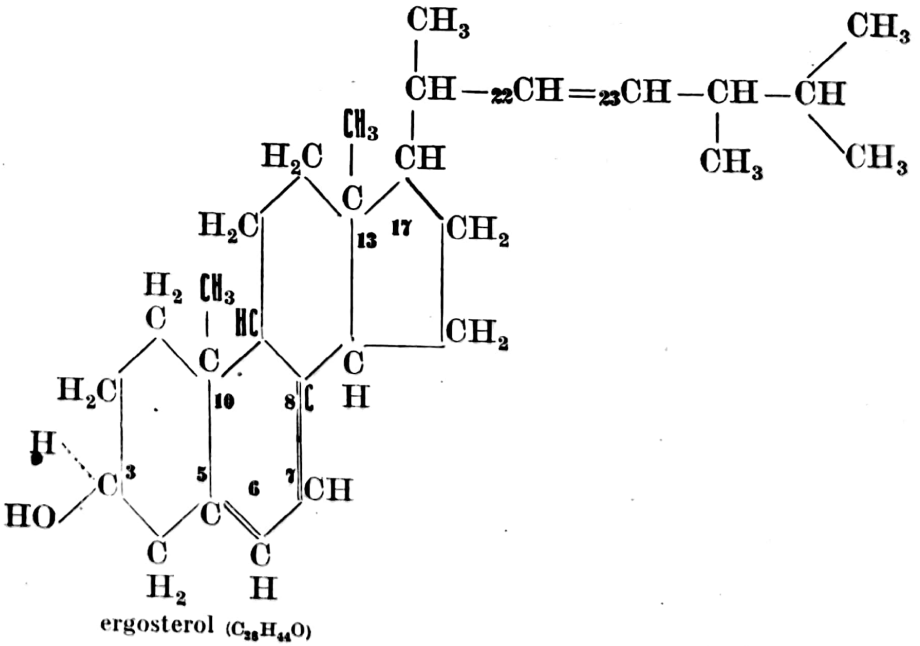


colesterolul ($C_{27}H_{45}OH$)

Scanned with OKEN Scanner

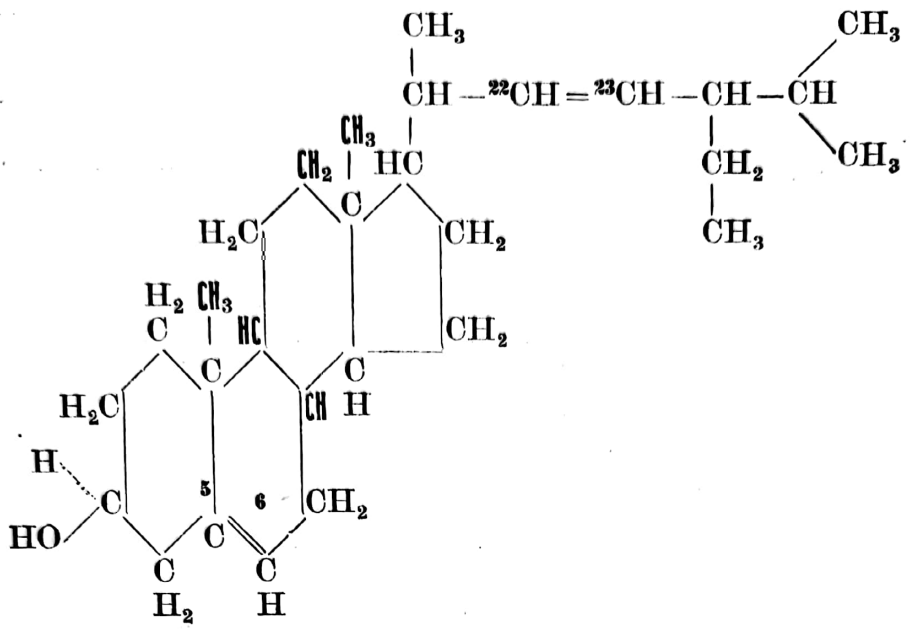


coprosterol ($C_{27}H_{48}O$)



ergosterol ($C_{28}H_{44}O$)

Scanned with OKEN Scanner



stigmasterol ($C_{29}H_{48}O$)

Ergosterolul are formula brută $C_{28}H_{..}O$, deci un C mai mult decât colesterolul, datorită substituirii în catena laterală la C_{24} a unei grupări metilice. (Stigmasterolul are substituit la acest C un radical etilic). Are trei legături duble, dintre care două duble legături conjugate în ciclul *B* între C_5 şi C_6 şi C_7 şi C_8 şi a treia legătură dublă în catena laterală între C_{22} şi C_{23}. Are ca şi colesterolul şi coprosterolul o funcţie de alcool primar la C_3.

Proprietăţile generale ale sterolilor

Proprietăţi fizice. Sunt solubili în solvenţi organici, insolubili în apă. Sunt compuşi cristalizaţi, albi strălucitori, optic activi, în genere levogiri, afară de coprosterol, care este dextrogir. Prezintă stereoizomerie la C_3 şi C_5, putând exista sub formele : β, epi, trans, cis. Formele naturale sunt β şi trans, numai coprosterolul este cis.

Proprietăţi chimice. Comportarea chimică a sterolilor este determinată de grupările funcţionale ce le conţin, şi anume funcţia alcoolică şi legăturile duble. Datorită funcţiei alcoolice pot forma esteri (aşa numitele steride), iar prezenţa legăturilor duble în moleculă le conferă caracter de nesaturare, proprietatea de a fixa halogeni. Valoarea „indicelui de iod" creşte paralel cu numărul dublelor legături din moleculă.

Reacţiile de recunoaştere ale sterolilor

Sunt următoarele :

reacţia Liebermann-Burchard : soluţia de steroli în cloroform tratată cu anhidridă acetică şi acid sulfuric dă o coloraţie verde. Reacţia serveşte la recunoaşterea şi la dozarea colesterolului în sânge ;

reacţia Salkowski, care identifică colesterolul şi ergosterolul prin coloraţiile pe care le dau soluţiile cloroformice ale acestor steroli în prezenţa SO_4H_2 conc. (colesterolul roşie, ergosterolul incolor).

Cu digitonina, care este o saponină, dau compuşi insolubili, caracteristici, care servesc la identificarea lor. Numai sterolii care au OH liber formează astfel de compuşi, de exemplu, colesterolul, pe când esterii acestuia, care au OH blocat, nu dau complecşii sterol-digitonina; deasemenea, numai izomerii β dau această reacţie, pe când izomerii epi nu o dau.

Derivaţi ai sterolilor

de mare importanţă biologică sunt: hormonii sexuali, vitaminele, hormonii corticosuprarenali, acizii biliari. Aceştia se vor studia la capitolul respectiv.

LIPIDELE

Lipidele rezultă din esterificarea acizilor graşi cu alcooli. Lipidele se pot împărţi în două grupe mari: lipide simple şi lipide complexe.

I. *Lipidele simple* sunt ca şi zaharurile compuşi ternari — conţin C, H şi O — dar au altă structură. După alcoolul care esterifică acizii graşi care intră în molecula lor, se pot clasifica în:

1. *gliceride* în care alcoolul care esterifică acizii graşi este glicerolul;

2. *steride,* în care alcoolul e un sterol;

3. *ceride,* în care alcoolul e un alcool din seria alifatică, cu moleculă mare;

4. *etolide,* care rezultă din esterificarea a doi compuşi, având fiecare funcţie şi de acid şi de alcool, aşa fel că gruparea acidă a uneia esterifică gruparea alcool a celuilalt.

II. *Lipidele complexe* conţin în afară de acizi graşi superiori şi alcooli şi alte componente care pot fi: amine, acid fosforic, glucide, sulfaţi.

După acest criteriu pot fi împărţite în:

1. lipide fosforate sau fosfatide,

2. lipide azotate nefosforate şi

3. lipide sulfurate.

1. *Lipidele fosforate sau fosfatidele* pot fi:

a) *acizi fosfatidici* care nu conţin în moleculă decât C, H, O, P;

b) *fosfoaminolipide,* care conţin în moleculă C, H, O, P şi N şi se împart în monoaminofosfatide şi diaminofosfatide.

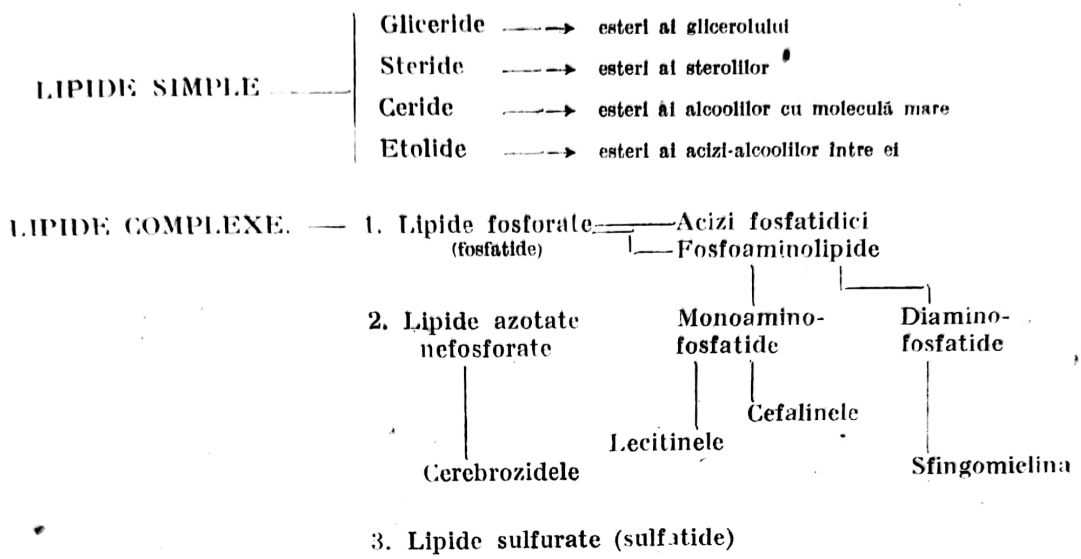
Monoaminofosfatidele pot avea structura unui ester, ca de exemplu *lecitinele* şi *cefalinele,* sau structura unui acetal, *plasmalogenele.* Printre diaminofosfatide este sfingomielina.

2. *Lipidele azotate nefosforate* sunt cerebrozidele.

3. *Lipidele sulfurate* conţin sulf cu sau fără fosfor (sulfatidele).

Scanned with OKEN Scanner

Clasificarea poate fi schematizată astfel:



I. Lipidele simple

A. Gliceridele

Grăsimile conținute în țesutul adipos al animalelor, precum și ca substanțe de rezervă la unele vegetale, sunt esteri ai glicerolului cu acizi grași cu un număr pereche de carboni, sunt trigliceride. Acizii grași care constitue aceste grăsimi sunt saturați [acidul palmitic cu 16 C ($C_{16}H_{32}O_2$), acidul stearic cu 18 C ($C_{18}H_{36}O_2$)] și nesaturați [acidul oleic cu 18 C ($C_8H_{34}O_2$)]. Acizii grași saturați se găsesc în special în grăsimile solide la temperatura ordinară; acidul nesaturat, oleic, predomină în uleiuri (vegetale) și în grăsimile lichide la temperatura ordinară, dar în general se găsesc amestecuri de trigliceride.

Trioleina este o trigliceridă formată din glicerol în care cei trei OH sunt esterificați cu câte o moleculă de acid oleic.

$$\begin{array}{l} CH_2-OOC-C_{17}H_{33} \\ | \\ CH\ -OOC-C_{17}H_{33} \\ | \\ CH_2-OOC-C_{17}H_{33} \end{array}$$

trioleina

Tripalmitina conține trei molecule de acid palmitic

$$\begin{array}{l} CH_2-OOC-C_{15}H_{31} \\ | \\ CH\ -OOC-C_{15}H_{31} \\ | \\ CH_2-OOC-C_{15}H_{31} \end{array}$$

tripalmitina

Tristearina, trei molecule de acid stearic.

$$\begin{array}{l} CH_2-OOC-C_{17}H_{35} \\ | \\ CH\ -OOC-C_{17}H_{35} \\ | \\ CH_2-OOC-C_{17}H_{35} \end{array}$$

tristearina

Gliceride mixte sunt:

Oleopalmitostearina este o gliceridă în care fiecare din cei trei OH este esterificat cu radicali diferiți (acid oleic, palmitic, stearic).

$$\begin{array}{l} CH_2-OOC-C_{17}H_{33} \\ | \\ CH\ -OOC-C_{17}H_{31} \\ | \\ CH_2-OOC-C_{17}H_{35} \end{array}$$

ester oleopalmitostearic

Stearodipalmitina formată din două molecule de acid palmitic și una de acid stearic, intră în structura grăsimii subcutanate.

Grăsimile pot exista sub diverse forme stereoizomere, stereoizomeria fiind datorită orânduirii diferite a aceluiaș acid gras în moleculă sau unei izomerii optice determinată de prezența unui C asimetric în molecula glicerolului sau de prezența unui acid gras optic activ. Pentru caracterizarea grăsimilor se determină punctul lor de topire. Valoarea acestui punct este în funcție de conținutul în acizi grași nesaturați și de lungimea catenei acizilor grași saturați. Grăsimile cu mulți acizi grași nesaturați în moleculă și cu acizi grași saturați cu moleculă mică au un punct de topire coborît.

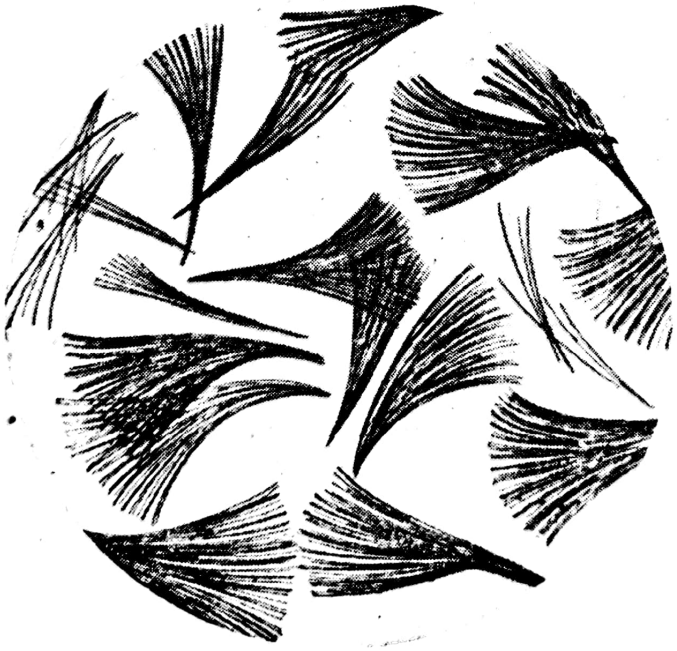


Fig. 39. Grăsime de porc

Punctul de topire al grăsimii de om este între 17 — 18°. Este una din cele mai puțin consistente, conținând 65 — —85% acid oleic. Cantitatea de acid oleic crește cu vârsta. Grăsimile diferitelor animale se pot diferența prin punctul lor de topire. Grăsimea de vacă are p.t. = 41 — 49°, cea de porc 36 — 46°. Indicații asupra compoziției grăsimilor sunt date de *„indicele de iod"* (indice Hübl) sau „cifra de iod", care reprezintă cantitatea de iod fixată de 100 g grăsime și este caracteristică fiecărei grăsimi în parte. Iodul este fixat la legăturile duble din molecula acizilor grași nesaturați care intră în

structura grăsimii. Cantitatea de iod fixată poate indica deci natura saturată sau nesaturată a acizilor graşi din molecula grăsimilor. Alte constante care servesc la caracterizarea grăsimilor sunt cifra de saponificare sau indicele de saponificare şi cifra de aciditate.

Se înţelege prin *indice de saponificare* cantitatea în miligrame de KOH care poate fi fixată, care saponifică un gram grăsime în soluţie cloroformică şi care se poate determina prin titrarea excesului de KOH rămas din reacţie. Stabilirea valorii acestui indice serveşte la determinarea greutăţii moleculare şi a constituţiei grăsimilor.

Cu cât mărimea acizilor graşi din molecula grăsimii (gliceridei) este mai mare, cu atât indicele de saponificare e mai mic. Grăsimile neutre sunt insolubile în apă, ele dau cu apa soluţii coloidale sau emulsii. Aceste emulsii pot fi stabilizate cu agenţi emulsionaţi, ca proteine, săruri biliare, etc. In prezenţa aerului, grăsimile suferă modificări speciale de descompunere în glicerol şi acizi graşi. Acizii graşi se transformă prin oxidare în oxiacizi, aldehide, cetone cu miros neplăcut şi gust iute. Este fenomenul de râncezire al grăsimilor. Cu cât grăsimile conţin mai mulţi acizi graşi nesaturaţi, cu atât râncezesc mai uşor. Acţiunea de descompunere poate fi datorită unei acţiuni chimice, fotochimice sau unor microorganisme.

Margarina, surogatul de unt, se fabrică din grăsimi animale uşor fuzibile şi din grăsimi vegetale.

Grăsimile neutre (gliceridele neutre) există la om în special în ţesutul adipos, în cantitate mică în sânge şi în celule. E probabil că organismul animal şi vegetal sintetizează grăsimile din zaharuri. Se deosebesc la organismele animale grăsimi de rezervă şi grăsimi de organe, având structuri deosebite

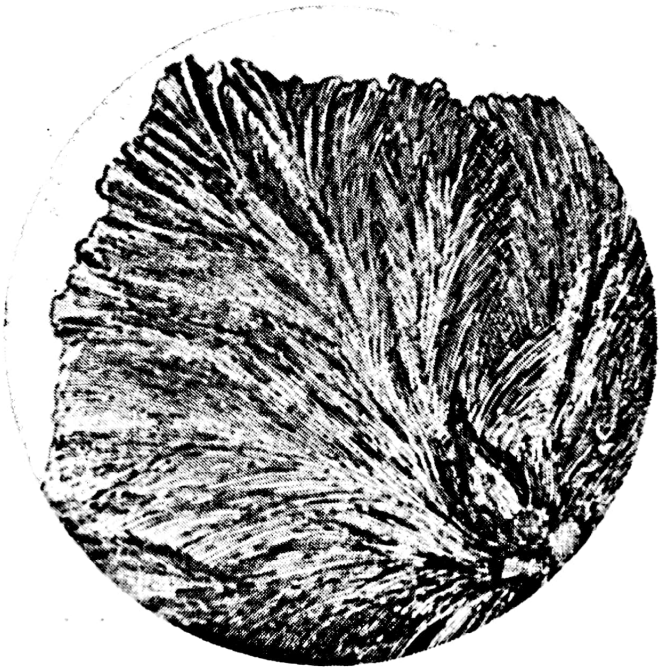


Fig. 40. Grăsime de oaie

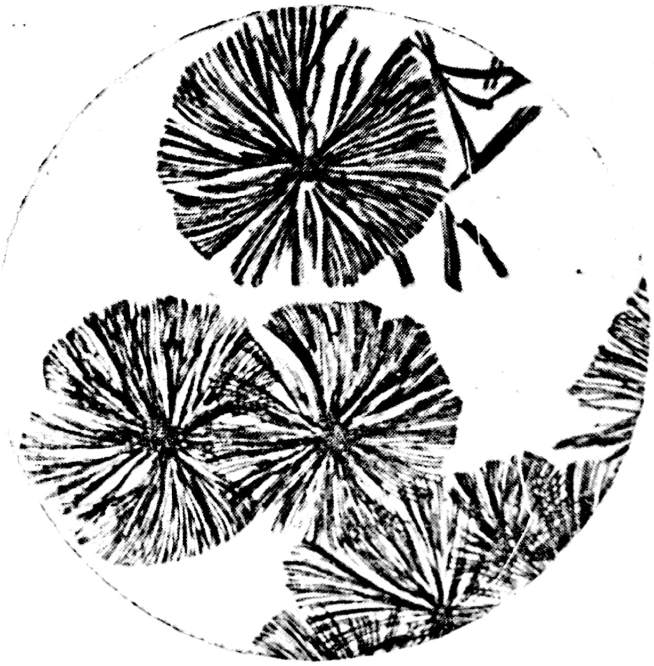


Fig. 41. Grăsime de vacă

una de alta. Grăsimile de rezervă sunt în general grăsimi neutre şi constitue sursa energetică importantă pentru organism. Conţin un număr mare de C şi H şi, cum aceştia pot fi oxidaţi, rezultă deci că au o cantitate mare de energie potenţială, de unde şi rolul fundamental în *termogeneza* animală.

Prin arderea complectă a 1 gram grăsime se pun în libertate 9,3 calorii, pe când prin arderea a 1 gram zaharuri numai 4,1 calorii, ambele constituind sursa energetică pentru organism.

B. Ceridele sau cerurile

Sunt lipide rezultate din esterificarea acizilor graşi superiori, dar nu cu glicerolul, ci cu alcooli aciclici cu greutate moleculară mare. Sunt foarte răspândite la vegetale, unde frunzele şi fructele sunt acoperite cu o pătură ceroasă de protecţie. Şi la animale, acolo unde se găsesc ceruri, acestea au rol de protecţie, fapt explicat prin marea lor rezistenţă la acţiunea diverşilor reactivi chimici.

Ceara de albine conţine palmitat de miricil ($C_{30}H_{61}OH$), acid cerolic (C_{26}) şi parafine superioare.

Albul de balenă se găseşte în cantitate mare la un mamifer marin, caşalotul şi conţine o ceară lichidă care este *spermaceti* şi una solidă *walratul.*

Numeroase plante conţin o ceară numită *ceara de Carnauba* (cânepa, bumbacul, trestia de zahăr).

Există o ceară extrasă din cărbunii fosili, numită ceara *montana.*

Lanolina este o ceară în care acizii graşi sunt esterificaţi de steroli.

C. Etolidele

Sunt lipide speciale găsite în cerurile unor conifere; sunt formate din două molecule, fiecare din ele având şi funcţie de alcool şi funcţie acidă. Funcţia acidă a uneia din molecule esterifică funcţia de alcool a celeilalte. In constituţia acestora intră mai ales acidul sabinic $C_{12}H_{21}O_3$ şi acidul juniperic $C_{16}H_{32}O_3$

$$R-CHOH-R'-COOH + HOOC-R'-CHOH-R \rightarrow$$

etolide

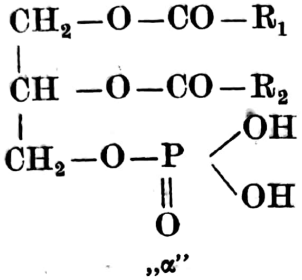
$$\rightarrow \quad R-CH-R'-CO$$
$$\quad\quad\quad

II. Lipidele complexe

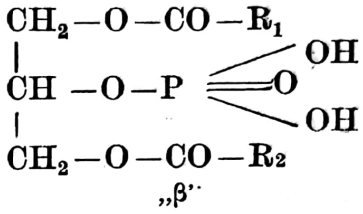
A. Lipidele fosforate

1. Acizii fosfatidici

Sunt esteri cu caracter net acid care conţin P. Sunt constituiţi dintr'un polialcool, acizi graşi şi acid fosforic. Caracterul acid al acestor esteri este datorit acidului fosforic, care conţine grupări acide nesubstituite :



„α"



„β"

Acizii fosfatidici sunt consideraţi totuşi ca lipide, deoarece sunt esteri ai acizilor graşi cu greutate moleculară mare. Polialcoolul din acizii fosfatidici este în general glicerolul. Se întâlnesc în general în vegetale (varză, spanac) şi în diverşi microbi (bacilul tuberculos). Nu se ştie dacă sunt produse intermediare în sinteza fosfatidelor sau dacă au un rol propriu în metabolismul animal.

2. Monoaminofosfatidele

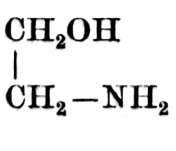
Conţin o moleculă glicerol, una de acid fosforic, o bază azotată. Au raportul P/N = 1/1. Acizii graşi esterifică glicerolul fie conform structurii esterilor propriu zişi, fie conform unei structuri acetalice.

Vor exista astfel : *esterfosfatide* şi *acetalfosfatide.*

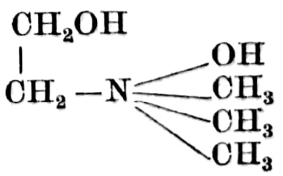
Esterfosfatide sunt *lecitinele* şi *cefalinele.* Sunt *monoaminoesterfosfatide.*

Acetalfosfatide sunt *plasmalogenele,* care sunt *monoaminoacetalfosfatide.*

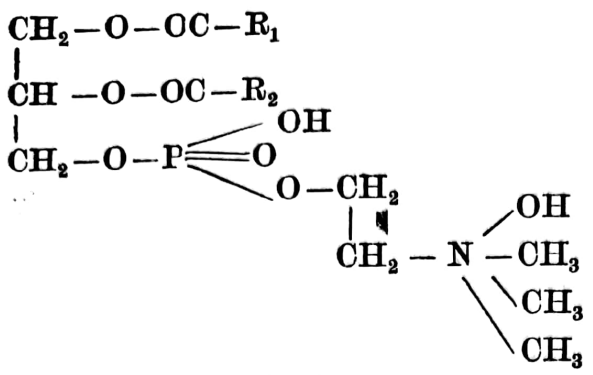
Esterfosfatidele. Lecitinele şi *cefalinele* sunt monoaminoesterfosfatide, care conţin în molecula lor o moleculă glicerol, două molecule de acid gras superior, o moleculă de acid fosforic şi o bază azotată care în lecitină este *colina,* în cefalină *colamina.* Acizii graşi şi acidul fosforic esterifică cele trei funcţii alcoolice ale glicerolului, baza azotată este fixată la acidul fosforic. Pot exista α- şi β-lecitine sau cefaline, după cum derivă din acidul α-glicerinfosforic sau β-glicerinfosforic.



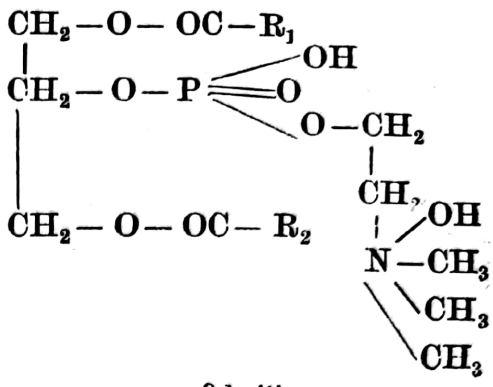
colamina



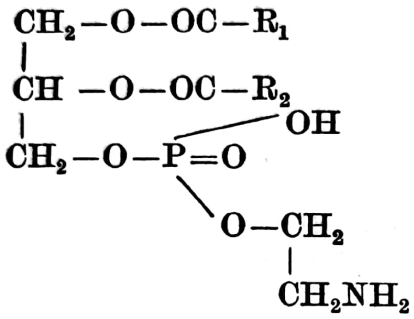
colina



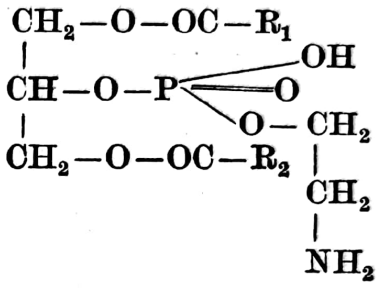
α-lecitina



β-lecitina



α-cefalina



β-cefalina

Acizii graşi din molecula cefalinelor şi lecitinelor sunt aceiaşi ca în grăsimile neutre : acidul palmitic, stearic, oleic, linolic, linolenic şi un acid gras cu patru legături duble, acidul arachidonic $C_{20}H_{32}O_2$. Acizii graşi nesaturaţi predomină cantitativ faţă de cei saturaţi. Există diverse lecitine şi cefaline, după natura acizilor graşi substituiţi. Fiecare din ele poate la rândul ei să existe sub forma izomerului α şi β. Prezenţa legăturilor duble, respectiv a acizilor graşi nesaturaţi în molecula lecitinelor şi cefalinelor, le conferă o anumită nestabilitate, o capacitate de a reacţiona mai uşor şi deaceea au un rol fiziologic foarte important. Lecitine fără acizi graşi nesaturaţi în moleculă nu se cunosc, se cunosc însă lecitine care au numai acizi graşi nesaturaţi, fără acizi graşi saturaţi. O experienţă foarte interesantă, care a demonstrat existenţa acizilor graşi nesaturaţi, a fost făcută cu lecitina de ou : supusă acţiunii unei enzime, lecitinaza, din veninul de Cobra, această enzimă poate scinda numai acidul gras nesaturat şi lasă intact restul moleculei care conţine numai acizi graşi saturaţi ; compusul astfel rămas are numele de *lizocitină* şi are acţiune hemolitică puternică. Acţiunea toxică a veninului de Cobra se atribue tocmai unei acţiuni de acest tip, care duce la o transformare a lecitinelor din sânge în lizocitine cu acţiune hemolizantă.

Lecitinele şi cefalinele se găsesc în toate celulele, în special în creier şi substanţa nervoasă, în muşchiul inimii, în gălbenuşul de ou (se extrag din acestea din urmă cu uşurinţă prin tratare cu acetonă şi cloroform, obţinându-se sub formă de pulbere). Prin hidroliză la autoclav cu un acid diluat se desfac toate componentele şi se obţin : acid fosforic, glicerol, colină sau colamină şi acizi graşi (oleic, stearic). Prin hidroliză mai blândă se obţine acidul α-sau β-glicerofosforic, fapt care a demonstrat că acidul fosforic e fixat la molecula glicerolului şi că există două lecitine, una α şi alta β.

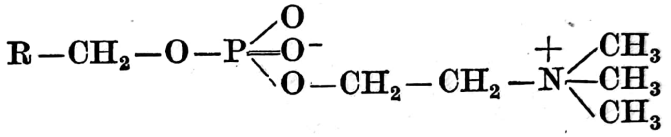
S'au izolat în adevăr două lecitine: una β optic inactivă şi una α optic activă. Lecitinele nu dau soluţii adevărate, ci emulsii cu caracter amfoter, având o funcţie bazică şi una acidă liberă care se compensează reciproc; aceea bazică aparţine bazei azotate colina, cea acidă acidului fosforic. Fosfatidele sunt deci amfioni. Componenta glicerol-acid fosforic din moleculă are afinitate pentru apă, este hidrofilă; componenta acid gras nu are afinitate pentru apă, este hidrofobă. Datorită acestor caracteristici, lecitinele în soluţii apoase formează aşa numitele pături monomoleculare cu moleculele hidrofile dirijate spre pătura apoasă şi cu cele hidrofobe în afară. Graţie acestui fapt, lecitinele ar avea un rol important în formarea membranelor celulare.

Cefalinele conţin în moleculă aceleaşi componente ca şi lecitinele, deosebirea între ele fiind baza azotată care la cefaline este *colamina*.

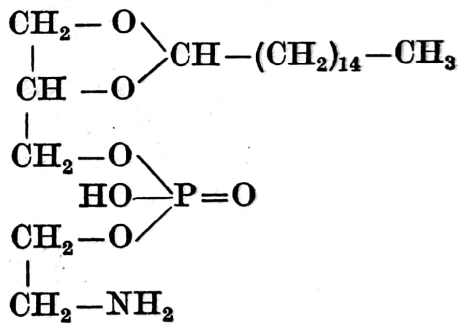
Au şi ele caracter de amfiioni.

Diferă între ele prin solubilitatea lor în alcool.

Se separă cu foarte mare greutate unele de altele din celula vie, unde coexistă. Caracterul amfiion se poate pune în evidenţă prin formularea:



Acetalfosfatidele sau *plasmalogenele* sunt tot monoaminofosfatide, dar cu structură acetalică. Se ştie că un acetal se formează prin eliminarea unei molecule de apă între gruparea alcool şi gruparea aldehidă. Sunt astfel lipide care sunt formate din alcool, glicerol, şi aldehida corespunzătoare unui acid gras, care esterifică alcoolul. Sunt astfel compuşi care conţin glicerol, aldehida corespunzătoare acidului palmitic sau stearic, acid fosforic, şi colamină. Sunt deci înrudite cu cefalinele, de care se deosebesc numai prin structura lor acetalică.



acetalfosfatidă

Pot exista sub formă α sau β. Sunt foarte răspândite în natură şi se presupune că ar avea un rol important ca produse intermediare în sinteza grăsimilor. Sub formă pură nu s'au putut prepara încă.

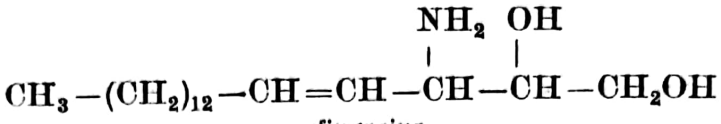
3. Diaminofosfatidele

Conţin o moleculă de acid gras, o moleculă de acid fosforic, o moleculă de colină şi un alcool, sfingozina, care face ca aceste substanţe să se numească şi *sfingomieline*. Raportul N/P în molecula lor este de 2/1.

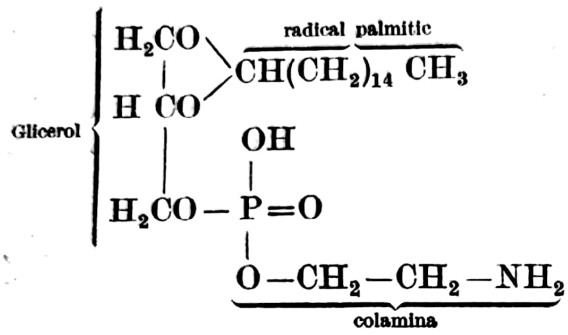
Se deosebesc deci de lecitine prin alcoolul pe care îl conţin.

Sfingozina este un aminodialcool nesaturat, care aduce în molecula fosfatidului încă o grupare aminică afară de aceea a bazei azotate. Ea este legată prin funcţia sa aminică cu acidul gras, iar prin una din funcţiile sale alcoolice cu acidul fosforic, acesta din urmă fiind la rândul său legat prin celălalt oxidril al său cu baza colină.

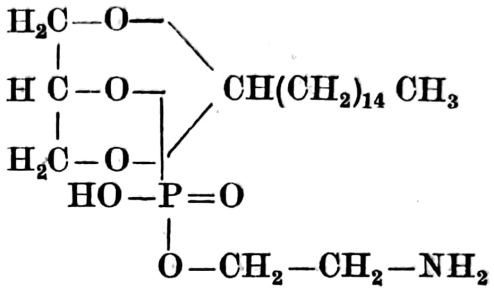
Există mai multe sfingomieline, care se deosebesc între ele prin acidul gras pe care îl conțin. La om, acidul gras este în general acidul lignoceric $C_{24}H_{48}O_2$.



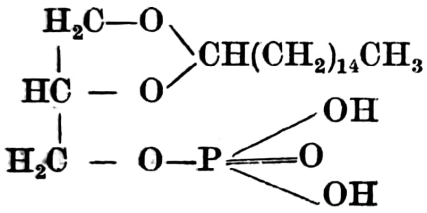
sfingozina



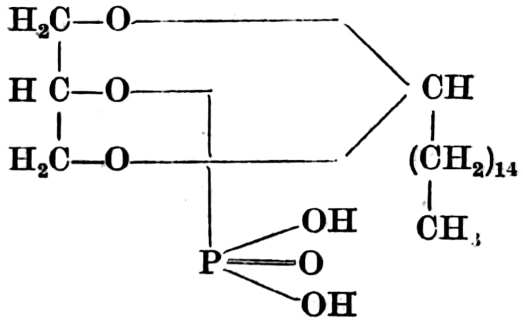
α-palmitalplasmalogen



β-palmitalplasmalogen

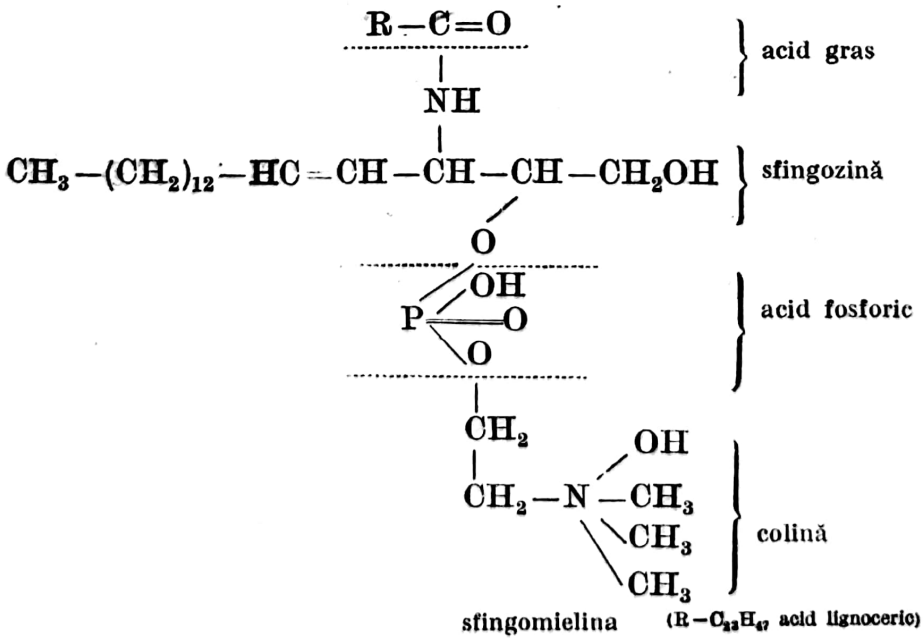


acid α-plasmalogenic



acid β-plasmalogenic

Acetalfosfatide

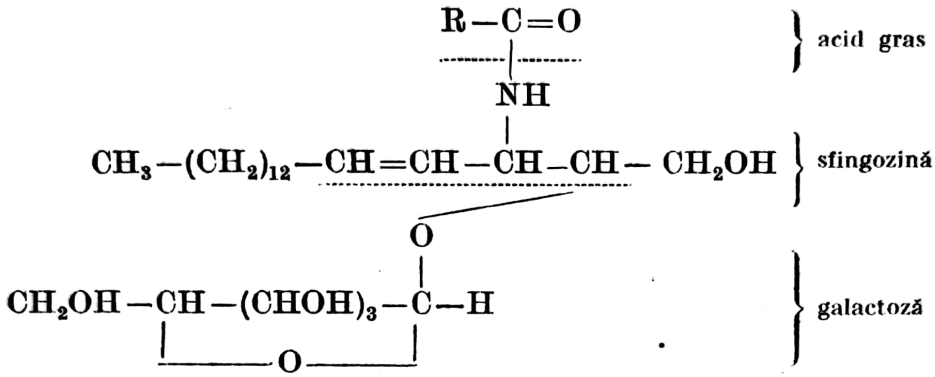


sfingomielina ($R-C_{23}H_{47}$ acid lignoceric)

Sfingomielinele se găsesc în special în sistemul nervos central, în cilindraxul celulelor nervoase, dar şi în alte ţesuturi.

B. **Lipidele azotate nefosforate**

C e r e b r o z i d e l e. Sunt lipide care nu au P. Ele conţin un zahar, galactoza, dela care se mai numesc şi *galactozide,* un acid gras superior şi un alcool aminat, aminodialcoolul sfingozina. Au structura generală :



Cerebrozidele se scindează cu uşurinţă, sub acţiunea hidrolitică a acizilor diluaţi, în componentele lor. Sfingozina şi galactoza sunt unite prin punţi de oxigen (ozidic), formând un heterozid. Acidul gras e unit cu sfingozina prin funcţia sa aminică. Se poate astfel elibera prin hidroliză sau numai acidul gras sau numai galactoza. Cerebrozidele se găsesc în special în substanţa nervoasă, dar şi în splină, suprarenală, plămân, muşchi, retină, leucocite, globule roşii.

Există patru cerebrozide care se deosebesc între ele prin acizii graşi pe care îi conţin şi anume :

a) *kerazina,* conţine acidul lignoceric : $C_{24}H_{48}O_2$;

b) *nervona,* în molecula căreia intră acidul nervonic :

$$C_{24}H_{46}O\,;$$

c) *cerebrona* sau *frenozina* cu acid cerebronic : $C_{24}H_{48}O_3$ şi

d) *oxinervona,* care conţine acidul oxinervonic :

$$C_{24}H_{46}O_3.$$

C. **Sulfatidele**

S'au izolat lipide care conţin sulf, dar sunt incomplect cunoscute. Unele sulfatide conţin şi fosfor în moleculă, altele conţin şi fosfor şi galactoză.

Derivaţii sterolilor

O serie de compuşi de importanţă biologică fundamentală sunt derivaţi ai sterolilor. Am amintit de aceştia : hormonii sexuali şi cortico-suprarenali, vitaminele D şi acizii biliari care constitue aşa numita grupă a *steroidelor.*

Afară de acizii biliari, pe care îi studiem aici, ceilalţi compuşi vor fi descrişi la capitolele respective.

Scanned with OKEN Scanner

Acizii biliari

Acizii biliari își datoresc numele prezenței lor în cantitate mare în bilă, produsul de excreție al ficatului. Sunt compuși complecși rezultați din conjugarea acizilor colici (care sunt derivați de steroli) cu un aminoacid, glicocolul, sau cu taurina, un derivat al aminoacidului cisteina. Se crede că sunt elaborați exclusiv de celulele hepatice.

Acizii colici sunt oxiacizi monocarboxilici, derivați de steroli; ca derivați ai acidului colanic sau alocolanic au o singură grupare COOH și mai multe grupări OH. Conjugarea cu aminoacizii respectivi (glicocolul sau taurina) se face prin eliminarea unei molecule de apă între gruparea carboxilică — COOH a acidului colic și gruparea — NH_2 a aminoacidului.

In constituția sărurilor biliare intră următorii acizi colici:

1. **acidul colanic** sau acidul colic propriu zis $C_{23}H_{39}O_3COOH$, cu trei grupări oxidrilice;
2. **acidul desoxicolic**: $C_{23}H_{39}O_2COOH$, cu 2 grupări oxidrilice;
3. **acidul litocolic**: $C_{23}H_{39}O\,COOH$, cu o grupare oxidrilică. Deci au același număr de $C_{(23)}$ și de $H_{(39)}$, o singură grupare COOH, dar un număr de oxigeni oxidrilici diferiți 3, 2, 1. Toți derivă din sterol, seria coprosterolului (acidul colanic) sau colesterol (acidul alocolanic); diferă între ei prin numărul de OH. Acidul colanic sau colic conține trei grupări OH fixate la C 3, 7 și 12; acidul desoxicolic două grupări OH fixate la C_3 și C_{12}; acidul litocolic o singură grupare OH fixată la carbonul 3.

Acizii biliari sunt produși astfel: *acidul glicocolic*, din conjugarea acidului colic cu glicocolul, iar *acidul taurocolic*, din conjugarea acidului desoxicolic cu taurina:

$$C_{23}H_{39}O_3-COOH + H_2N-CH_2-COOH \longrightarrow C_{23}H_{39}O_3-CO-NH-CH_2COOH$$

acidul colic — glicocolul — acidul glicocolic

$$C_{23}H_{39}O_2-COOH + H_2N-CH_2-CH_2-SO_3H \longrightarrow C_{23}H_{39}O_2-CO-NH-CH_2-CH_2-SO_3H$$

acidul desoxicolic — taurina — acidul taurocolic

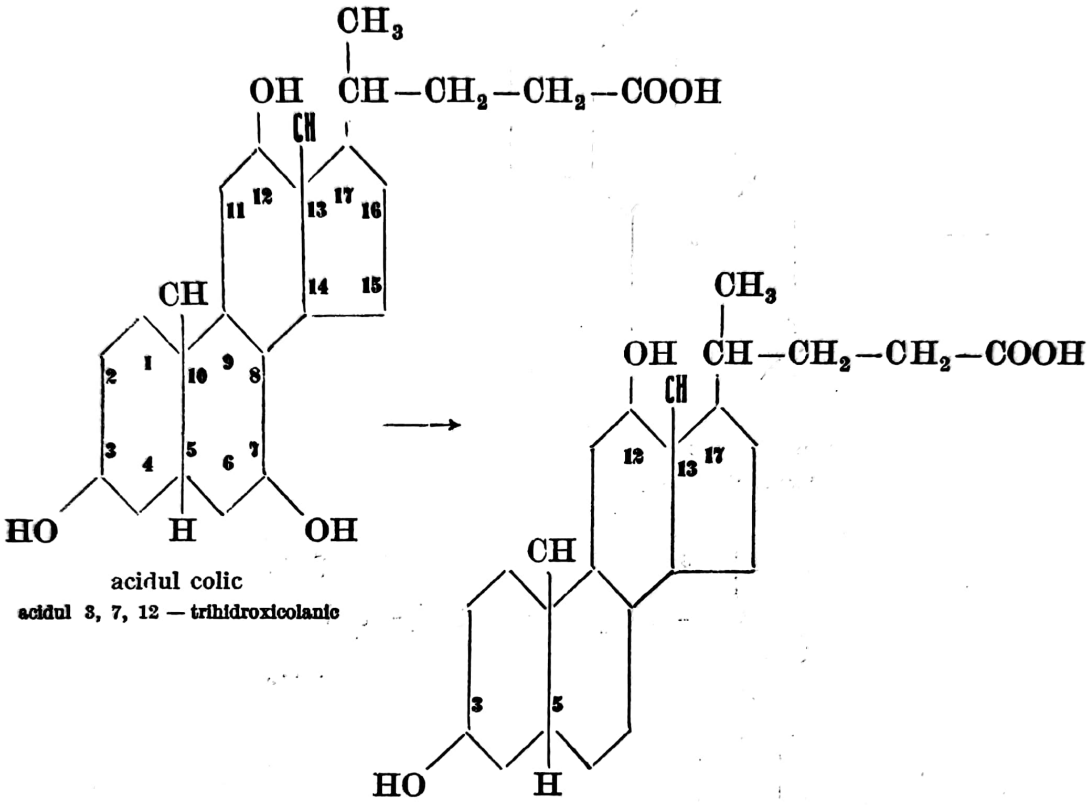
In bila umană predomină acidul glicocolic. Acizii biliari se găsesc în bilă sub formă de săruri de sodiu, solubile în apă. Deaceea se mai cunosc și sub numele de săruri biliare. Apar în urină în special în bolile de ficat. Sărurile biliare sunt tensioactive, proprietate care e utilizată pentru a pune în evidență prezența lor în urină (reacția Hay cu floare de sulf). Mai pot fi decelați prin reacția *Petenkoffer*, care constă în obținerea unei colorații roșie-violetă în prezența zaharozei și a acidului sulfuric concentrat. Se pot izola acizii biliari din bilă prin evaporarea bilei și extracția lor cu alcool absolut și eter; precipită sub formă de cristale (cristalele lui Plattner).

Organismul animal poate sintetiza acizii biliari. Sinteza se face în ficat.

Au un rol fundamental în resorbția grăsimilor, respectiv a acizilor grași, datorită proprietății acestora de a forma cu acizii biliari compuși solubili, deci capabili de a fi resorbiți, așa numiții *acizi coleinici*; colesterolul, carotenele, vitaminele D pot deasemenea să se combine cu acizii biliari, formând compuși solubili.

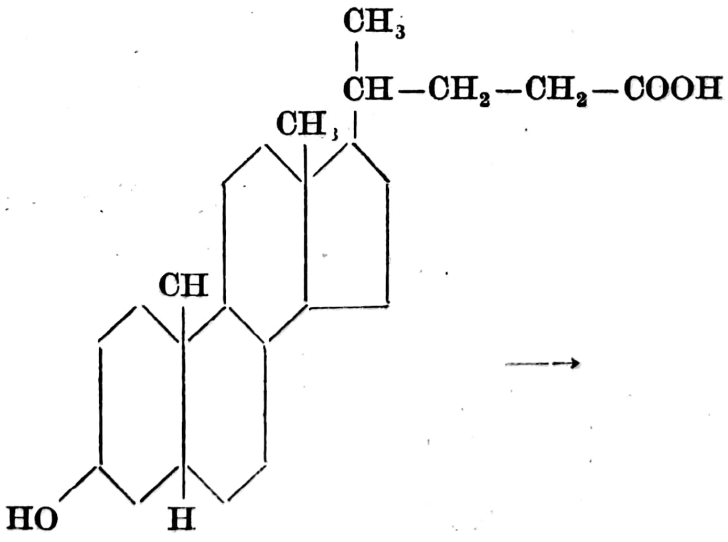
Derivaţi ai sterolilor

Acidul colic : $C_{23}\ H_{39}\ O_5\ COOH$
Acidul desoxicolic : $C_{23}\ H_{39}\ O_2\ COOH$
Acidul litocolic : $C_{23}\ H_{39}\ O\ COOH$

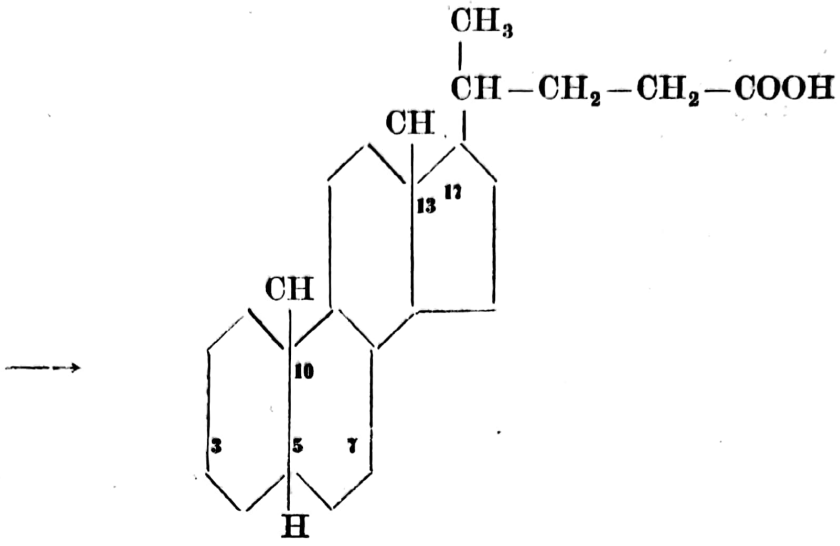


acidul colic
acidul 3, 7, 12 — trihidroxicolanic

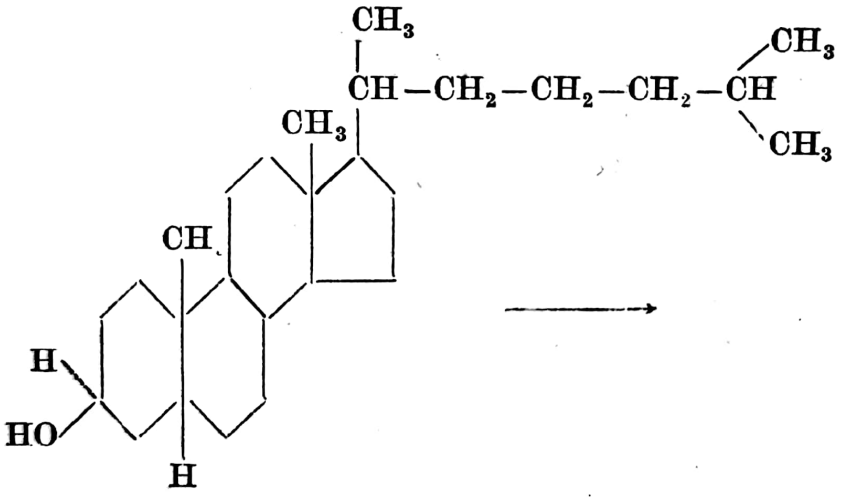
acidul desoxicolic
acidul 3,12—dihidroxicolanic



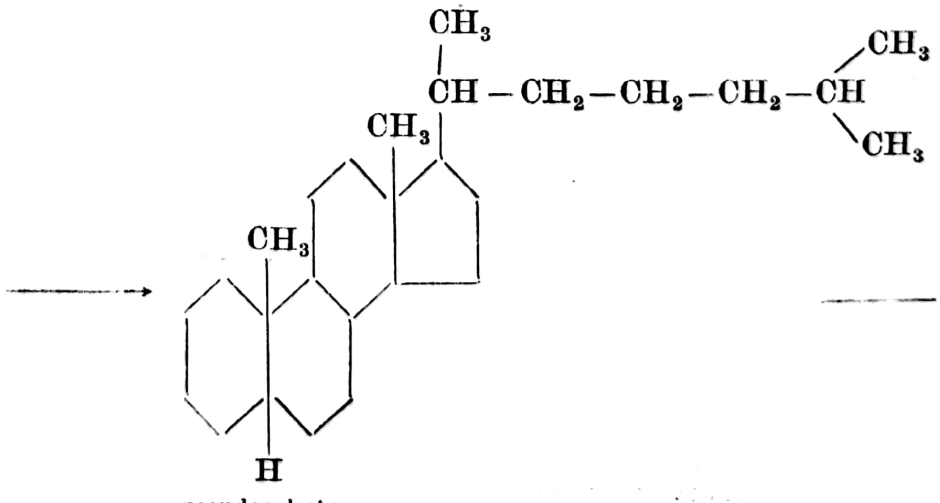
acidul litocolic
acidul 3—hidroxicolanic



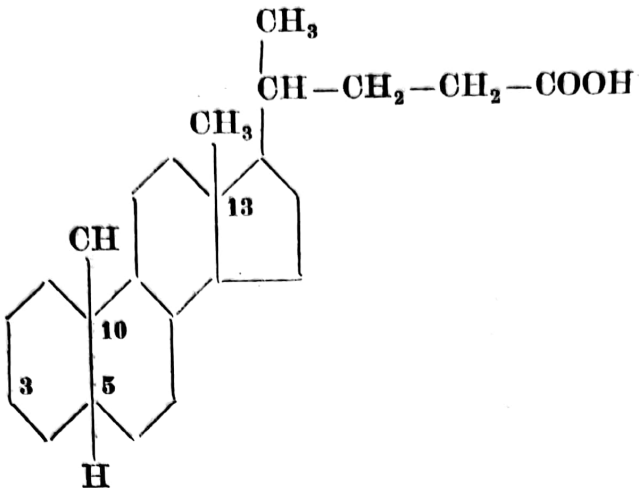
acidul colanic
$C_{23}H_{39}COOH$



coprosterol

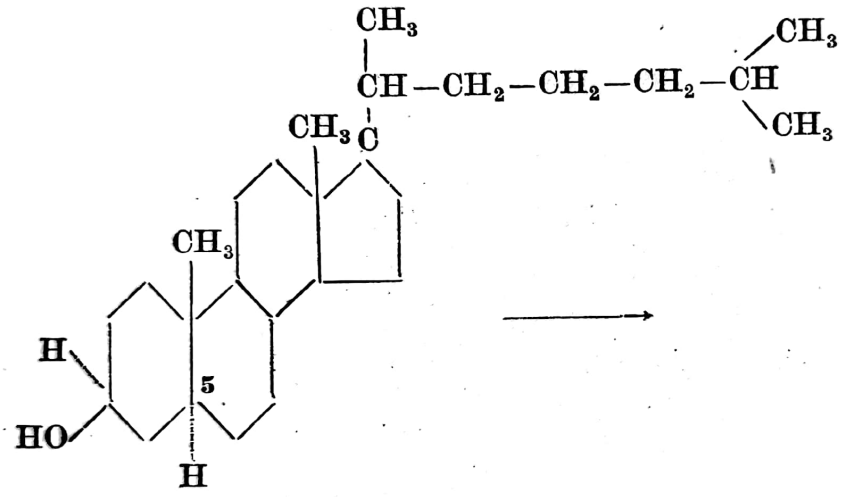


pseudocolestan

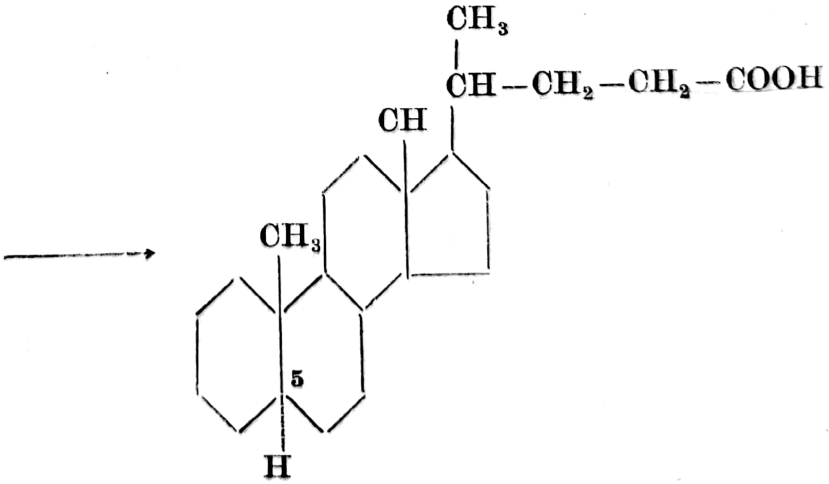


acidul colanic

Colesterol → dehidrocolesterol



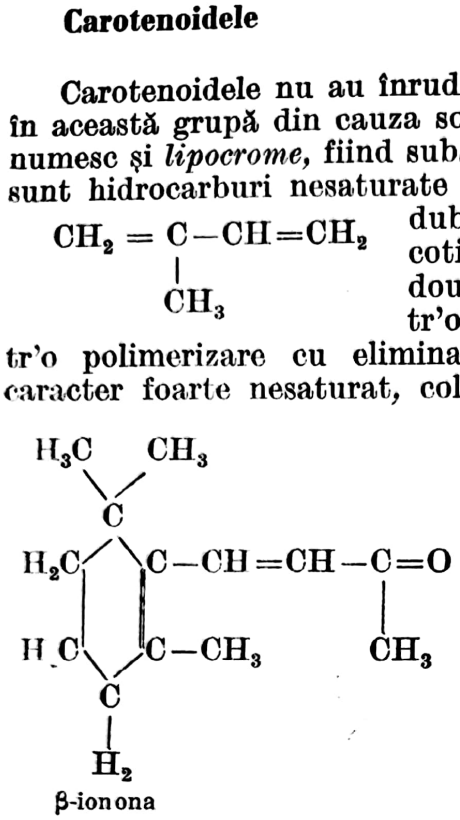
colestanol



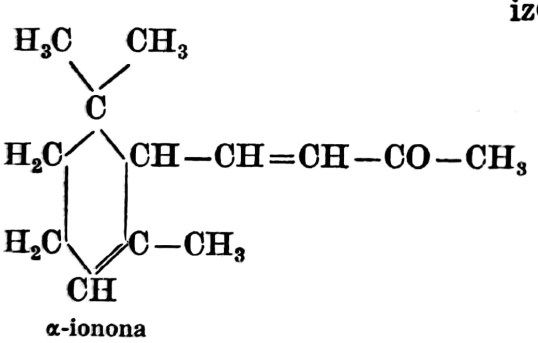
acidul alocolanic

Carotenoidele

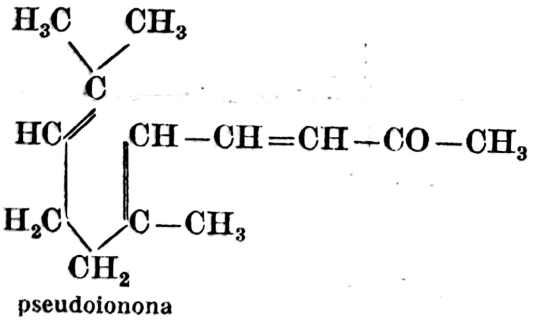
Carotenoidele nu au înrudire de structură cu lipidele, dar se clasifică în această grupă din cauza solubilității lor în solvenții grăsimilor. Se mai numesc și *lipocrome*, fiind substanțe colorate. Din punct de vedere chimic sunt hidrocarburi nesaturate sau derivați ai acestora cu multe legături duble conjugate. Sunt deci poliene. Se pot socoti ca derivați de isopren, hidrocarbură cu două legături duble conjugate, rezultând printr'o multiplicare mare a acestei molecule, printr'o polimerizare cu eliminare de hidrogen. Sunt deci compuși cu caracter foarte nesaturat, coloratia lor fiind datorită tocmai prezenței legăturilor duble conjugate.



β-ionona



α-ionona



pseudoionona

Prin saturarea acestor legături duble cu alți radicali, devin incolore.

Se cunosc vreo 20 de carotenoide, care se deosebesc între ele prin numărul atomilor de C din moleculă și prin radicalii substituiți la capetele lanțului isoprenic, care pot fi grupări metilice, OH, aldehide, cetone, etc.

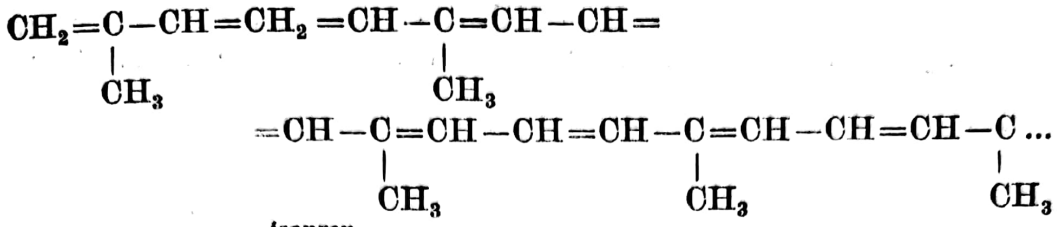
Se găsesc în genere în amestecuri și sunt greu de izolat. Prin adsorbție selectivă, prin cromatografie, s'a reușit izolarea lor (Țvet).

Licopina e carotenoidul din pătlăgele roșii. Carotenoide importante prin relația lor structurală cu vitamina A sunt *carotenele*, de unde derivă și numele de carotenoide, dat întregii clase de compuși.

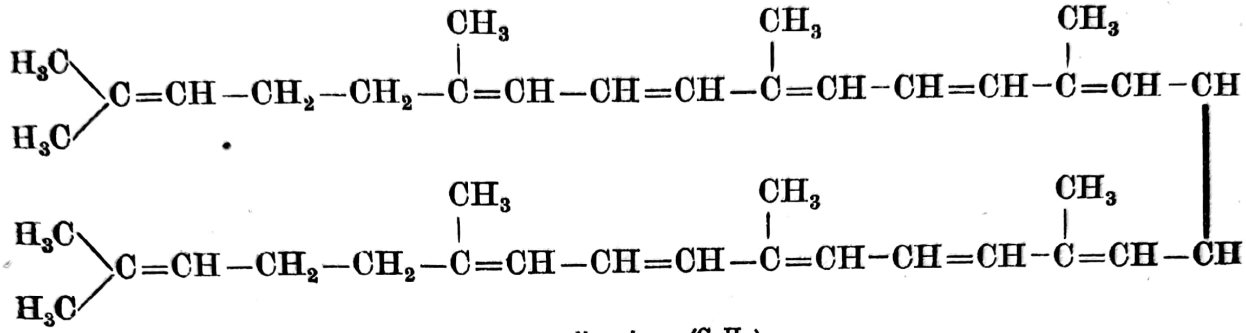
Se cunosc astfel trei carotene, α, β și γ care se găsesc în amestec și constitue așa numitul *caroten*.

α, β și γ-*carotenele* se deosebesc între ele prin grupările terminale ale catenei izoprenice și anume: α-*carotenul* e format dintr'un lanț alifatic de 18 C și 9 legături duble conjugate; are drept grupări terminale un ciclu β-iononic, un ciclu α-iononic și 4 grupări metilice. β-carotenul are două cicluri β-ononice; γ-*carotenul* are un ciclu β-ononic și un ciclu pseudoiononic.

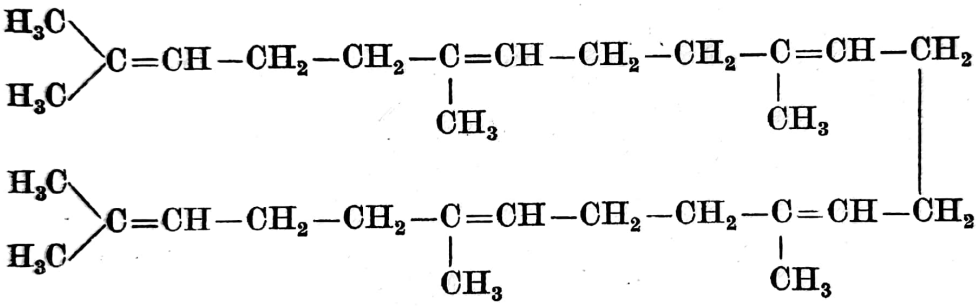
Iononele sunt terpene care conțin o funcție cetonică; există trei ionone. α și β-iononele au structură ciclică, pseudoionona are structură aciclică. α-ionona se deosebește de β-iononă prin poziția dublei legături din ciclu, iar pseudoionona are un ciclu deschis.



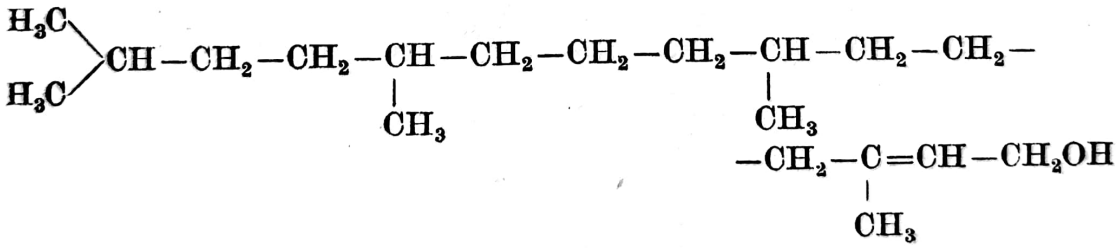
izopren



licopina ($C_{40}H_{56}$)



scalen



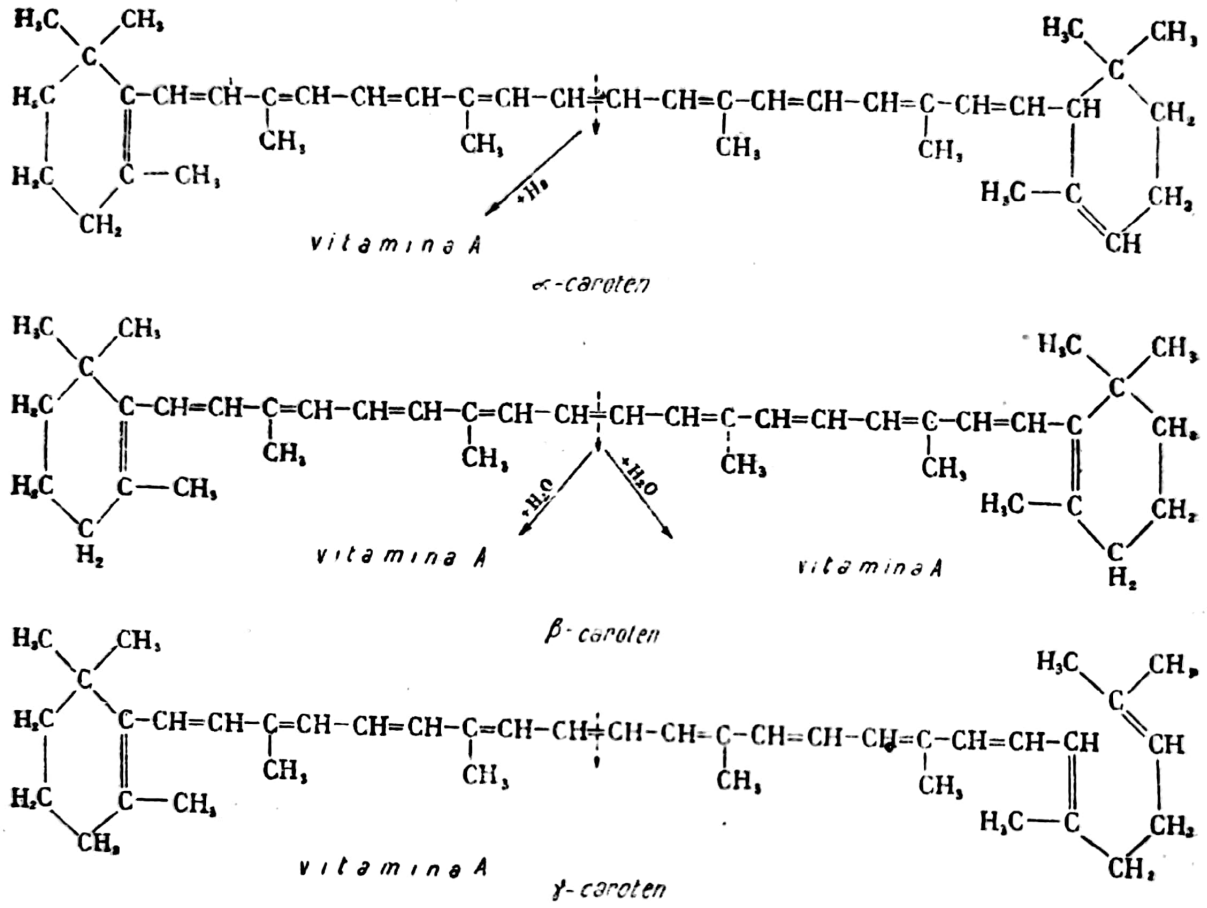
fitol

Pentru organismul animal carotenele au o importanță fundamentală, ele fiind provitaminele vitaminei A. Prin scindarea moleculei carotenelor în două, sub acțiunea enzimei carotenaza în ficat, se obțin din β-caroten două molecule de vitamină A, din α- și γ-caroten câte o moleculă de vitamină A (fracțiunea care conține ciclul β-iononic).

Origina carotenoidelor e strict vegetală, nu pot fi sintetizate de organismul animal, care le primește ca atare din vegetale. Se găsesc în grăsimi, lapte, ouă, suprarenale, dar aduse cu alimentele. Găinile hrănite cu o alimentație lipsită de carotenoide au gălbenușul alb.

Xantofilele sunt carotenoide vegetale care apar în special la păsări. Se crede că substanțele carotenoide ar avea un rol important în ciclul

vizual; astfel, experienţe făcute pe ochiul de broască indică prezenţa xantofilei. La plante, carotenoidele ar avea rol de substanţe de creştere.



Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL II

BIOCATALIZATORII

DEFINIŢIE

Biocatalizatorii sunt componenţii care în organismul viu reglează reacţiile chimice ce sunt la baza fenomenelor vieţii.

Caracterul comun al acestor compuşi este următorul : există în organism în cantităţi extrem de mici şi au totuşi o activitate extrem de intensă. Nu li se poate atribui un rol plastic (nu sunt substanţe cu rol structural), deoarece există în cantităţi atât de mici, şi nu li se poate atribui un rol energetic, deoarece există o disproporţie între intensitatea acţiunii lor şi concentraţia lor mică ; sunt însă absolut indispensabili unei normale funcţionări — absenţa lor ducând totdeauna la turburări grave şi adesea la moartea organismului.

Sunt indispensabili transformărilor metabolice în condiţiile de temperatură, pH, presiune, compatibile cu viaţa.

Biocatalizatorii se împart în trei grupe mari : 1) *vitaminele*, 2) *hormonii* şi 3) *enzimele*.

Clasificarea aceasta nu înseamnă însă că există o barieră strictă între aceste grupe. Cercetările recente au arătat că între vitamine şi hormoni există relaţii structurale strânse, iar acestea la rândul lor constitue adesea faze premergătoare ale enzimelor, deci între aceste trei grupe nu există o soluţie de continuitate, lucru pe care îl vom vedea lămurit atunci când vom arăta structura chimică a acestor substanţe.

Denumirea de biocatalizatori dată acestor grupe de compuşi este datorită analogiei de acţiune cu catalizatorii cunoscuţi demult în chimia minerală. Sunt de fapt *catalizatori biologici*.

Pentru a înţelege modul de acţiune al biocatalizatorilor este necesar a preciza în prealabil noţiunile generale, caracteristice fenomenelor de cataliză.

CATALIZA

Primul care a definit noţiunea de catalizator a fost Berzelius (1835). După acest autor, un catalizator este o substanţă care, prin simpla sa prezenţă şi fără a lua parte în mod aparent la o reacţie, înlesneşte această reacţie.

După W. Ostwald, un catalizator nu poate crea reacţii care să nu fie posibile şi în mod spontan; el poate numai să modifice viteza acestor reacţii.

Catalizatorii care accelerează viteza unei reacţii se numesc *catalizatori pozitivi*; în acest caz, procesul este o cataliză pozitivă; catalizatorii care întârzie viteza unei reacţii se numesc *catalizatori negativi*, iar cataliza e în acest caz o cataliză negativă.

CARACTERELE GENERALE ALE FENOMENELOR CATALITICE

1. O acţiune este catalitică numai atunci când sistemul care influenţează viteza de reacţie este de natură strict materială. Nu se defineşte ca acţiune catalitică modificarea unei reacţii sub influenţa unei energii, termică, luminoasă, etc.

2. Catalizatorul acţionează extrem de activ şi în cantităţi extrem de mici. Există deci o disproporţie între concentraţia mică a catalizatorului care intervine într'o reacţie şi transformările mari pe care le catalizează. Nu există un raport stoichiometric între catalizator şi substratul asupra căruia acţionează. Acest lucru reiese cu o evidenţă impresionantă în cataliza biologică, unde cantităţi infime de substanţă catalizatoare pot influenţa mecanismul biologic al unui întreg organism.

S'a putut dovedi că acţiunea catalitică a unei singure molecule de crocină (pigmentul colorat al safranului) este suficientă pentru a stimula formarea cililor şi mişcările lor independente la celulele sexuale ale unei alge verzi.

3. In reacţiile reversibile, catalizatorul nu modifică starea de echilibru, ci numai viteza cu care se realizează acest echilibru.

Fie reacţia reversibilă clasică, esterificarea şi saponificarea, respectiv scindarea esterilor şi sinteza lor:

acetatul de etil + apa $\rightleftarrows$ acidul acetic + alcoolul etilic

$$CH_3COOC_2H_5 + H_2O \rightleftarrows CH_3COOH + C_2H_5 - OH$$

Reacţia aceasta se petrece spontan extrem de lent, viteza de reacţie şi constanta de echilibru fiind date de legea acţiunii masselor, în funcţie de temperatura de reacţie. La echilibru, raportul celor patru componente care există în sistem este următorul:

2/3 acetat de etil + 2/3 apă $\rightarrow$ 1/3 acid acetic + 1/3 alcool etilic.

Această stare de echilibru, condiţionată de legea acţiunii masselor, se stabileşte, în absenţa unui catalizator, în intervalul de câteva săptămâni şi, dacă acest sistem e lăsat în repaus, el nu se modifică nici după 17 ani. Dacă se adaugă acestui sistem urme de ioni H^+ sub forma unui acid mineral, echilibrul acesta e atins în câteva ore. La sfârşitul reacţiei, acidul e regăsit integral, deci a avut o acţiune catalitică deoarece a modificat viteza de reacţie, fără ca aparent el însuşi să fi intrat în reacţie. In această acţiune catalitică, starea de echilibru final nu a fost modificată, ea fiind condiţionată de legea acţiunii masselor, respectiv de principiul al II-lea al termodinamicii pe care se bazează această lege, conform căruia constanta de echilibru e aceeaşi, indiferent de calea prin care se petrece reacţia. Un catalizator rămâne neschimbat înainte şi după reacţia pe care o catalizează; dacă ar realiza în acelaş timp şi o deplasare a echi-

Scanned with OKEN Scanner

librului ar însemna că energia necesară acestei deplasări provine din nimic sau cel mult din energia moleculară, ceeace ar contrazice principiul al doilea al termodinamicii. Catalizatorul grăbeşte atingerea stării de echilibru, dar nu modifică poziţia echilibrului.

4. Acţiunea catalizatorilor este specifică. Se înţelege prin specificitatea unui catalizator, capacitatea acestuia de a acţiona numai asupra unui singur substrat sau cel mult asupra unei grupe de substanţe cu caractere comune şi de a cataliza numai anumite reacţii. Specificitatea poate fi strictă sau mai puţin strictă; este strictă atunci când poate cataliza o singură reacţie şi poate acţiona asupra unui singur substrat. Să luăm un exemplu din chimia organică. Un amestec de oxid de carbon şi hidrogen poate da naştere la o serie întreagă de compuşi a căror formare este termodinamic posibilă. In prezenţa nichelului drept catalizator se va forma un singur compus : metanul (CH_4); în prezenţa oxizilor de zinc şi de crom se formează alcoolul metilic, CH_3OH, iar în prezenţa oxizilor de cobalt, hidrocarburi lichide de tipul benzinei sintetice. Fiecare din catalizatorii menţionaţi accelerează deci selectiv una din reacţiile posibile, celelalte petrecându-se în mod spontan şi ele, dar cu o viteză atât de mică încât sunt mascate de reacţia specific catalizată, care se petrece cu o viteză foarte mare. Prezenţa unui catalizator în sistem favorizează deci una din reacţiile posibile, în dauna celorlalte, care, pentru a putea fi puse în evidenţă, trebue accelerate catalitic de catalizatorul specific corespunzător.

Specificitatea diverşilor catalizatori poate varia dela o strictă specificitate la una mai puţin strictă. Catalizatorii biologici sunt caracterizaţi printr'o mare specificitate; de exemplu, enzimele acţionează asupra unui singur substrat chimic şi chiar asupra unui singur izomer optic. Există însă catalizatori chimici a căror specificitate este foarte puţin strictă, de exemplu ionii H^+ catalizează aproape toate reacţiile de hidroliză independent de substrat (polizaharide, protide, grăsimi, reacţii de oxido-reducere, polimerizare, etc.).

MECANISMUL ACŢIUNII CATALITICE

In acord cu teoriile actuale asupra reacţiilor chimice, corpurile care reacţionează trebue să fie în prealabil activate, activare care necesită energie. Energia minimă necesară activării moleculelor se numeşte *„energia de activare"*. Funcţia catalizatorului este de a micşora nivelul energiei de activare necesar unei reacţii date, deci de a realiza această reacţie cu o energie de activare mai mică decât aceea cu care se petrece în mod normal. Dacă se exprimă energia de activare în calorii/mol, pentru descompunerea H_2O_2 fără catalizator este necesară o energie de activare egală cu 18 000, în timp ce reacţia se petrece cu o energie de activare egală cu 11 700 în prezenţa platinei coloidale, iar în prezenţa catalazei hepatice, cu o energie de activare egală cu 5 500. Hidroliza cazeinei se face în prezenţa HCl cu o energie de activare egală cu 26 000, iar în prezenţa tripsinei cu o energie de activare egală cu 12 000. Descreşterea nivelului energiei de activare măreşte viteza de reacţie, deoarece în acelaş interval de timp un număr mai mare de molecule sunt suficient de activate pentru a putea reacţiona eficace. Se pune acum problema : prin ce mecanism realizează catalizatorul coborîrea nivelului energiei de activare?

Scanned with OKEN Scanner

Existența unei specificități în acțiunea lui face să se presupună că el trebue să intervină direct și prin structura sa chimică caracteristică, deși la sfârșitul reacției se regăsește intact. Se crede că se formează un complex intermediar între catalizator și substratul asupra căruia lucrează. Vom vedea în cele ce urmează că mecanismul e oarecum diferit după cum avem de a face cu o cataliză în mediu homogen sau în mediu heterogen.

Cataliza homogenă are loc când catalizatorul intră ca o componentă homogenă în sistemul în care se petrece reacția catalitică, adică e în aceeași stare fizică cu componentele care reacționează. In cataliza homogenă nu există suprafețe de separație între substrat și catalizator. De exemplu, catalizatorul este disolvat în soluția substratului sau ambele în același solvent. Un exemplu tipic de cataliză homogenă e acela al ionilor H^+ în procesele de hidroliză: invertirea zaharului.

Mecanismul catalizei în mediu homogen se explică prin formarea unor produse intermediare extrem de nestabile între catalizator și corpurile care reacționează. Acești compuși intermediari nestabili se descompun cu ușurință și eliberează moleculele în stare născândă activă, având o energie potențială mai mare decât aceea inițială. In prezența catalizatorului, procesele trec printr'o serie de reacții intermediare, necesitând energii de activare mai mici decât energia de activare a reacției necatalizate. Fie o reacție $R_1 + R_2 = R_3 + R_4$ care se petrece cu o anumită viteză în prezența catalizatorului K.

Reacția se petrece în etape, și anume:

$$1)\ R_1 + K = R\,K$$

$$2)\ R_1K + R_2 = R_3 + R_4 + K$$

energiile de activare ale reacțiilor intermediare fiind mai mici decât energia de activare necesară reacției directe $R_1 + R_2 + R_3 + R_4$.

Cataliza prin ioni H^+ și OH^-. Un caz particular de cataliză în mediu homogen extrem de frecvent și important din punct de vedere practic este cataliza prin acizi și baze sau prin ionii H^+ și OH^-. Studiul cantitativ al acestei catalize a dus la o concepție nouă asupra formei în care ar exista ionul H^+ în soluție și în genere la o nouă definiție a acizilor și bazelor.

Se credea multă vreme că intensitatea acțiunii catalitice a ionilor H^+ sau OH^- este direct proporțională cu concentrația acestor ioni în soluție; or, acest lucru nu e adevărat decât pentru anumite reacții (invertirea zaharozei în glucoză și fructoză); în alte cazuri (mutarotația glucozei, de exemplu) acest lucru nu e just decât în anumite limite. Pentru a explica aceste fapte, Brönstedt admite că ionul H^+ în soluție se găsește în majoritate sub forma hidratată, fixând o moleculă de apă, deci ca ion H_3O^+ (numit și ion hidroxoniu, oxonium sau hydronium, asemănător ionului NH_4^+) și foarte puțin sub forma de ioni H^+ (proton), aceasta deoarece ionul H^+ (ionul fără niciun electron) nu poate exista liber în soluție. Hidroxoniul rezultă deci din fixarea protonului la o moleculă de apă. In soluția unui acid vom avea deci alături de ioni H^+ liberi sau protoni și ioni H_3O^+, precum și moleculele nedisociate ale acidului. Brönstedt numește acid orice substanță care poate ceda un proton, de exemplu CH_3COOH; H_3O^+; NH_4^+ pot ceda protoni, deci sunt acizi; el numește bază orice substanță care poate primi un proton, de exemplu, CH_3COO^-, NH_3^-; H_2O; HO^-. După el, cataliza prin acizi și baze s'ar face prin formarea

unor produse intermediare între catalizator şi substrat. In cataliza acidă, catalizatorul cedează un proton substratului; în cataliza bazică substratul cedează un proton catalizatorului. Produsele intermediare formate, fiind ioni, se descompun cu uşurinţă, schimbând protonii între ei şi regenerând catalizatorul.

Mecanismul catalizei în mediu heterogen. Când starea de agregare a catalizatorului este diferită de aceea a sistemelor care reacţionează, vorbim de o cataliză heterogenă sau în mediu heterogen; de exemplu, cataliza prin metale e o cataliză heterogenă. In cataliza heterogenă există suprafeţe de separaţie între catalizator şi mediu de reacţie. Acţiunea catalitică în mediu heterogen e iniţial o acţiune de suprafaţă şi e legată de structura fizică şi compoziţia chimică a acestei suprafeţe. Această acţiune se petrece în mai multe etape. Prima etapă este o difuziune, şi ulterior o adsorbţie la suprafaţa catalizatorului, a atomilor şi moleculelor care trebue să reacţioneze. Prin aceasta se realizează o pătură monomoleculară, în care deci moleculele care trebue să reacţioneze sunt foarte apropiate; numărul şocurilor în unitatea de timp fiind mai mare, viteza de reacţie va fi mai mare şi ea.

In a treia etapă are loc o coborîre a energiei de activare a moleculelor, ca şi în cataliza homogenă, prin formare de compuşi intermediari nestabili între moleculele catalizatorului şi moleculele care trebue să reacţioneze. In această etapă, catalizatorul intervine printr'o acţiune chimică, ceeace explică şi caracterul de specificitate a acţiunii sale. Fiecare catalizator lucrează într'un anumit fel, specific lui, asupra moleculelor adsorbite. De exemplu, sub acţiunea catalitică a oxidului de aluminiu, alcoolii se deshidratează la 300° cu formare de hidrocarburi nesaturate $CH_3-CH_2OH \xrightarrow[300^0]{} CH_2 = CH_2 + H_2O$, iar sub acţiunea catalitică a cuprului metalic se produce o dehidrogenare:

$$CH_3 - CH_2OH \xrightarrow[300^0]{} CH_3 - C\begin{matrix}H\\ \diagup\\ \diagdown\\ O\end{matrix} + H_2$$ cu formare de aldehidă.

A patra etapă este desfacerea moleculelor rezultate din reacţie de pe suprafaţa catalizatorului, iar a cincia etapă, difuzarea acestor molecule în mediul gazos sau lichid, unde existau înainte de a reacţiona. Se vede că în mediu heterogen cataliza se petrece la suprafaţa catalizatorului şi deci şi structura acesteia este determinantă pentru acţiunea lui catalitică. Acţiunea catalitică e în funcţie atât de mărimea suprafeţei de contact, cât şi de structura ei.

Se ştie că platina accelerează viteza de reacţie între H şi O. Această accelerare se explică printr'o adsorbţie a H_2 molecular la suprafaţa metalului; adsorbţiei îi urmează o cedare de electroni ai metalului, ceeace duce la o transformare a atomilor în ioni activi care, sub această formă, reacţionează mult mai uşor. Cu cât suprafaţa de contact dintre catalizator şi mediul în care trebue să se petreacă reacţia este mai mare, cu atât acţiunea catalitică va fi mai intensă.

Aşa se explică dece metalele sub formă coloidală au acţiune mai intensă decât sub formă de lame sau fire. Astfel, o moleculă gram de platină coloidală e mai activă decât o mol. gram de platină sub formă de lamă. Depunerea de substanţe solide sau lichide pe suprafaţa catalizatorului poate împiedica parţial sau complect acţiunea acestuia. Substan-

ţele care pot provoca o astfel de acţiune se numesc *„inhibitori"*. Inhibitorii pot lucra în cantităţi extrem de mici, de exemplu, 1/10 000 (impurificări de produse sulfurate în hidrogenul utilizat la prepararea amoniacului din N şi H în prezenţa catalizatorului). Fierul intoxică acest catalizator, scăzându-i acţiunea, iar doza de 1/10 000 o anulează complect; CNH deasemenea inhibă acţiunea catalitică a fierului. In afară de substanţe care inhibă acţiunea catalitică, există şi substanţe care o stimulează; acestea au numele de *„promotori"*. De exemplu, fierul poate fi activat de uran, de molibden.

Partea I

VITAMINELE

Vitaminele fac parte din grupa catalizatorilor biologici. In cantităţi extrem de mici intervin în reglarea şi stimularea proceselor metabolice normale. Nu intră în structura ţesuturilor. Lipsa lor din alimentaţie produce bolile prin carenţă. Vitaminele sunt cunoscute biologic mai mult prin absenţa decât prin prezenţa lor, deoarece trebue să fie mai întâi provocate simptomele caracteristice deficienţei unei vitamine pentru a putea demonstra ulterior efectul acesteia.

Vitaminele nu pot fi sintetizate ca atare de organismul animal, ci numai de plante. Organismul animal primeşte aceste substanţe indispensabile odată cu alimentaţia vegetală, fie sub forma lor activă de vitamină, fie sub o formă premergătoare, dar foarte apropiată, de provitamină, care ulterior e transformată în organism în formă activă de vitamină. Vitaminele sunt astfel *biocatalizatori exogeni* (spre deosebire de *hormoni* care sunt *biocatalizatori endogeni*).

Vitaminele sunt compuşi organici existând în cantităţi mici în alimentele naturale, care trebue puse la îndemâna organismului animal pentru ca funcţiile metabolice specifice să poată fi realizate normal.

AVITAMINOZE - HIPOVITAMINOZE - HIPERVITAMINOZE

Lipsa totală de vitamine sau provitamine din alimentaţie duce la turburări importante, cunoscute sub numele de „avitaminoze"; lipsa unei singure vitamine este cunoscută sub numele de *avitaminoză,* a mai multor vitamine de *poliavitaminoză.* Lipsa parţială a acestora din alimentaţie duce la scăderi ale facultăţilor normale ale întregului organism, cu apariţie de fenomene caracteristice carenţei fiecărei vitamine în parte. Un aport insuficient de vitamine duce la fenomene de hipovitaminoză. Uneori, însă, aportul exagerat de vitamine poate duce deasemenea la turburări cunoscute sub numele de hipervitaminoze.

Desechilibrul provocat de lipsa vitaminelor din alimentaţie este cunoscut sub numele de „boală prin carenţă".

Starea premergătoare carenţei confirmate se numeşte „stare de precarenţă".

Stabilirea stării de precarenţă este foarte importantă, deoarece indică măsurile care trebue luate pentru a preveni starea de carenţă propriu zisă. Stigmatele fiziologice ale precarenţei se găsesc în sânge, în ţesuturi, unde apar înaintea fenomenelor de carenţă confirmată şi pot fi puse în evidenţă cu ajutorul metodelor de laborator.

Scanned with OKEN Scanner

Determinarea calitativă şi cantitativă a vitaminelor se face prin metode biologice şi metode chimice.

Metodele biologice sunt bazate pe determinarea dozei minime de vitamină necesară pentru a preveni simptomele de carenţă provocate la animalele alimentate cu o dietă complectă, dar lipsită de vitamina care trebue controlată.

Metodele chimice şi fizico-chimice au început să fie aplicate în momentul când izolarea şi identificarea chimică a vitaminelor au luat o extindere mai mare.

In ultimul timp se aplică şi *metode microbiologice,* cu ajutorul cărora se determină necesitatea în anumită vitamină pentru multiplicarea diverselor bacterii sau ciuperci, crescute în medii speciale, şi pentru care vitamina cercetată este o componentă indispensabilă.

Pentru a putea reglementa unitar ţesuturile s'a convenit să se exprime concentraţia vitaminelor în unităţi internaţionale cu ajutorul „preparatelor standard", care permit comparaţii unitare între diversele rezultate. Cu aceste preparate standard de mare puritate s'au putut arăta că activitatea fiziologică a unor vitamine este de ordinul 1 γ.

CLASIFICAREA VITAMINELOR

Vitaminele se clasifică în două grupe mari:

1. vitamine liposolubile şi

2. vitamine hidrosolubile, după cum se disolvă în solvenţi organici sau în apă.

Acţiunea fiziologică a unei vitamine este în funcţie de prezenţa în moleculă a unei anumite grupări chimice caracteristice; această acţiune persistă atâta timp cât molecula nu este modificată prea profund.

Vom descrie fiecare vitamină în parte.

VITAMINELE LIPOSOLUBILE

In această grupă intră *vitamina A, vitaminele D, vitamina E, vitamina K, vitamina F.*

Vitamina A

Vitamina A are şi numele de vitamina *antixeroftalmică* sau *axeroftol*; se mai numea şi *vitamina de creştere liposolubilă, vitamina antiinfecţioasă, vitamina de apărare a epiteliilor*; fiecare din aceste denumiri corespunde uneia din acţiunile fiziologice ale acestei vitamine.

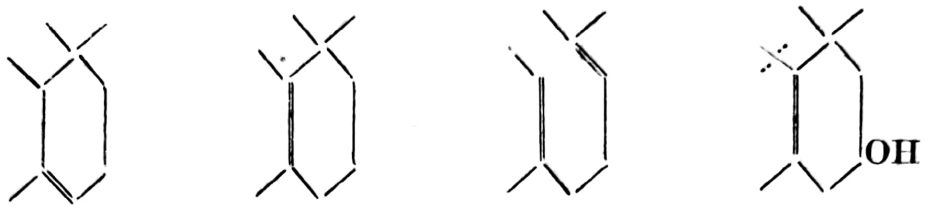
Structura chimică a vitaminei. Are formula brută $C_{20}H_{30}O$. Este un monoalcool primar cu 5 legături duble conjugate.

Provitaminele vitaminei A sunt c a r o t e n e l e. Structura vitaminei A a fost stabilită după ce s'a identificat structura chimică a acestora.

Carotenele sunt pigmenţii galbeni, portocalii, roşii din plante.

Toate carotenele sunt de origină vegetală şi au fost izolate şi diferenţiate cu ajutorul cromatografiei pe coloană, metodă imaginată de botanistul rus Ţvet şi care constă în adsorbţia pe un adsorbant adecvat

a substanţelor dintr'un amestec; fiecare din aceste substanţe având viteza de difuziune diferită, se pot adsorbi la nivele diferite.



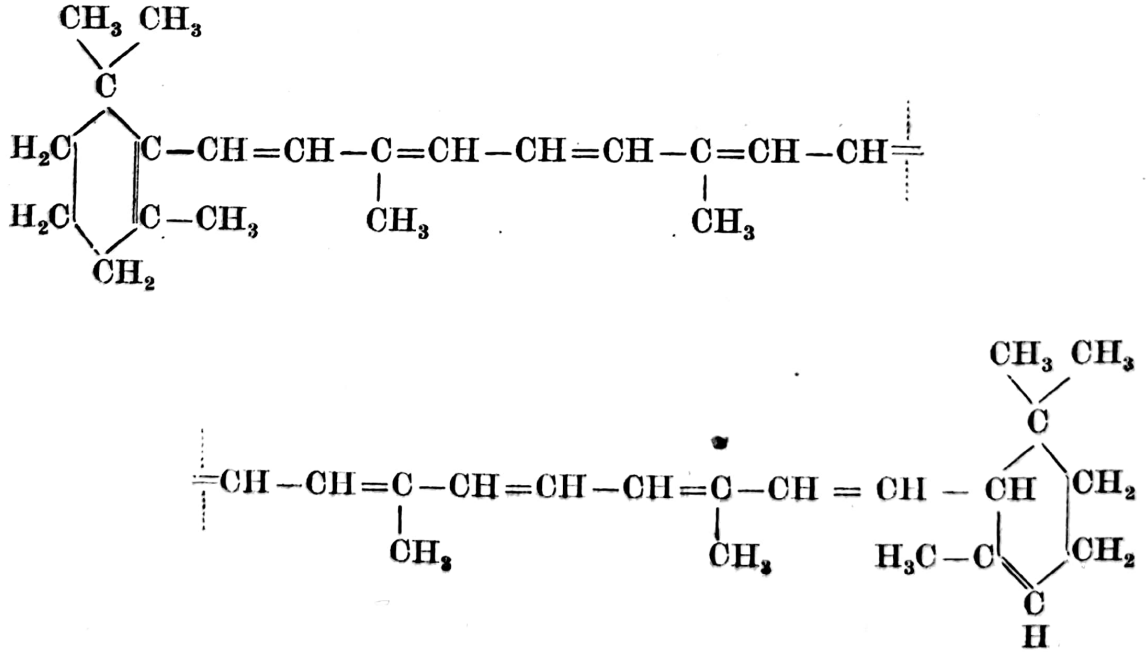
inelul α-carotenului — inelul β-carotenului — inelul γ-carotenului — inelul criptoxantinei

Se cunosc 4 carotene naturale care sunt provitamine ale vitaminei A, şi anume α, β, şi γ carotene şi criptoxantina. Primele 3 sunt izomere între ele. Au formula brută $C_{40}H_{56}$. Se deosebesc între ele prin activitatea lor optică; se găsesc împreună în carotene. Am văzut că din punct de vedere chimic aparţin hidrocarburilor nesaturate cu mai multe legături duble conjugate. Sunt deci poliene (vezi capitolul lipidelor).

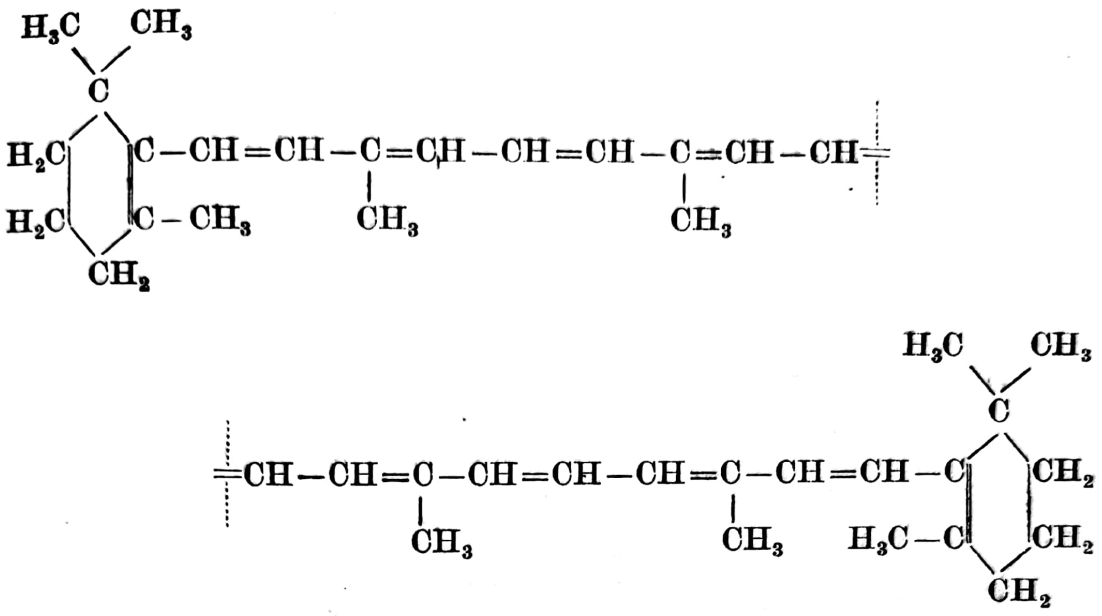
Carotenul α este format dintr'un lanţ alifatic de 18 carboni legaţi între ei prin 9 legături duble conjugate; conţine 4 grupe metilice substituite la 4 grupe —CH=. In mijlocul catenei este restul etilenic— CH= = CH —, iar la capetele catenei se găsesc două cicluri tetrahidrobenzenice din care unul aparţine α-iononei, celălalt β-iononei, cicluri care se deosebesc între ele prin poziţia legăturii duble. Ciclul α-iononei conţine un C asimetric, datorită căruia α-ionona e optic activă.

Carotenul β conţine acelaş lanţ polienic, dar ciclurile terminale sunt ambele ciclurile β-iononei, deci are structură absolut simetrică.

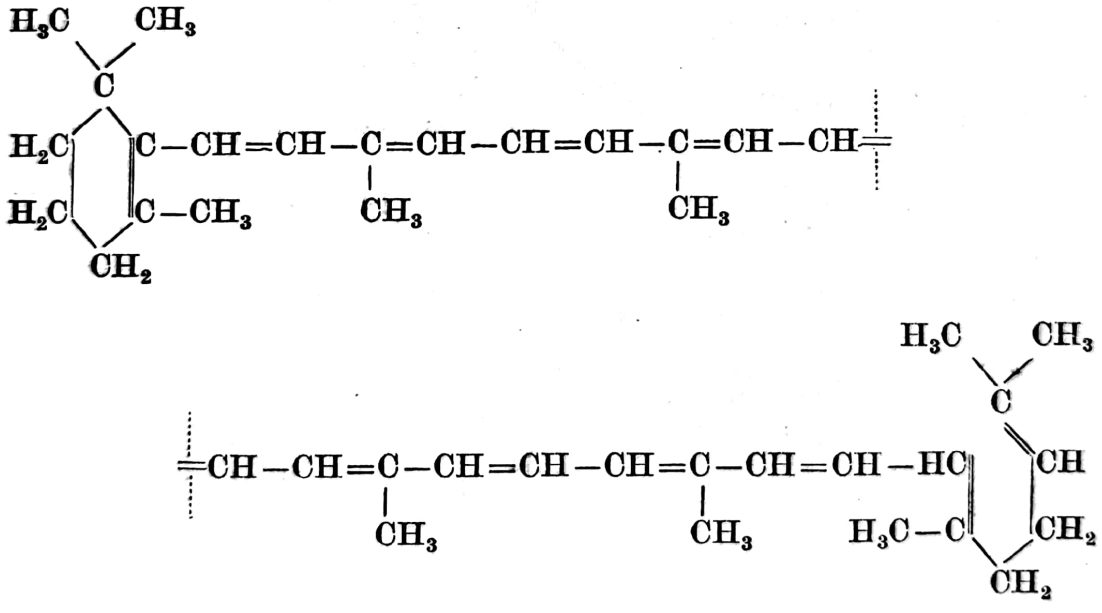
Carotenul γ are şi el acelaş lanţ polienic, dar la unul din capete are ciclul β-iononei, la celălalt un ciclu deschis al pseudoiononei (vezi formulele):



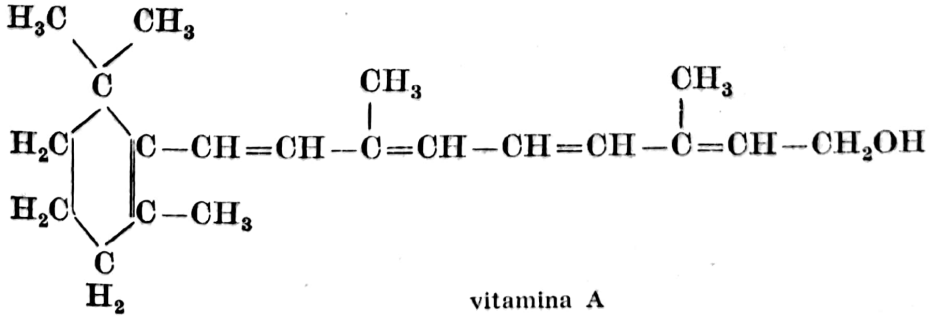
α-caroten



β-caroten

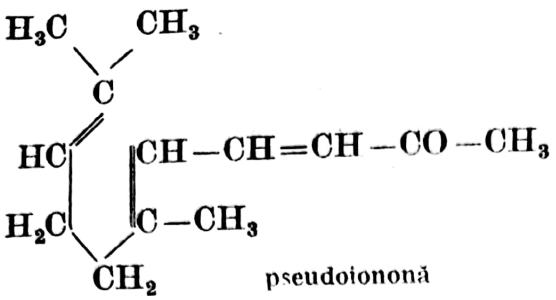


γ-caroten

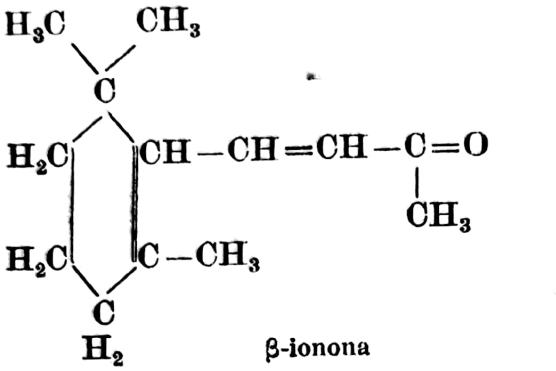


vitamina A

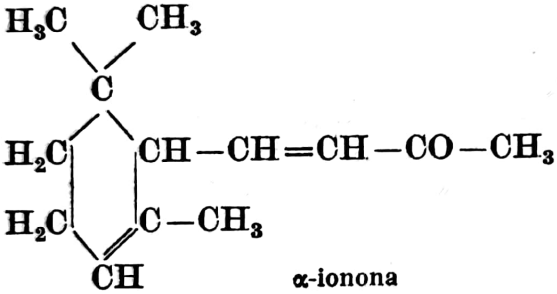
Scanned with OKEN Scanner



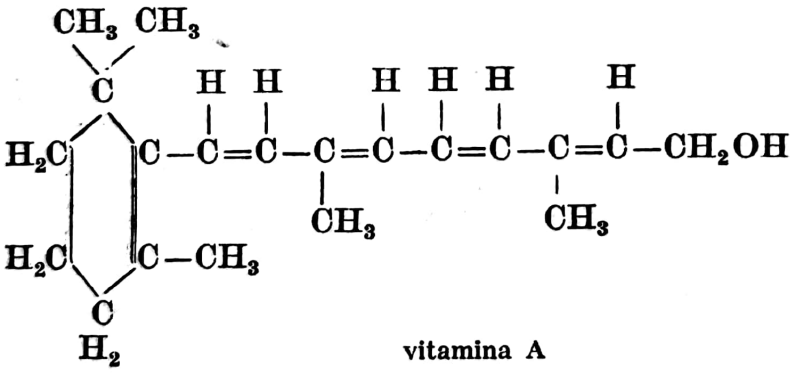
pseudoiononă



β-ionona



α-ionona



vitamina A

Aceste trei carotene sunt provitaminele vitaminei A, care rezultă prin scindarea lor hidrolitică la dubla legătură centrală: $-CH=CH-$. Are loc o scindare cu fixarea componentelor apei la cele două fracţiuni care se scindează.

Molecula β-carotenului fiind simetrică (conţine două cicluri β-iononice) duce la două molecule de vitamină A.

α- şi γ- carotenele conduc la câte o singură moleculă, ele conţinând numai un singur ciclu β-ononic. Acestea posedă deci jumătate din activitatea β-carotenului.

Ciclul β-ononic intact este necesar pentru rolul de provitamină al carotenelor, ciclul terminal din molecula vitaminei A având totdeauna structură β-iononică.

Vitamina A are formula brută $C_{20}H_{30}O$; conţine o grupare alcool primar identificată prin formarea de esteri şi cinci legături duble conjugate. Structura a fost pe deplin lămurită prin sinteza sa de către Karrer. Vitamina A poate exista sub forma a patru izomeri posibili. In untura de peşte s'a găsit un izomer diferit de vitamina A în configuraţia cistrans la dubla legătură vecină grupării OH.

Vitamina A este distilabilă în vid, proprietate folosită pentru concentrarea şi prepararea comercială a acestei vitamine din untura de peşte. Este un lichid galben uleios. In absenţa oxigenului este stabilă chiar la temperaturi mai mari; în prezenţa oxigenului este repede distrusă. Lumina exercită deaseme nea o acţiune de distrugere a vitaminei A, deaceea se conservă untura de peşte în sticle brune sau negre. Radiaţiile ultraviolete distrug vitamina A.

Metodele de determinare a vitaminei A sunt metode chimice, fizice şi biologice.

Metodele chimice sunt bazate pe culoarea pe care o dă vitamina A în soluţie cloroformică cu triclorura de antimoniu — coloraţie albastră cu viraj spreroz-roşu, a cărei intensitate este în funcţie de concentraţie (reacţia Carr-Price).

Metoda fizică: metoda spectrofotometrică, bazată pe absorbţia selectivă caracteristică în ultraviolet a acestei vitamine. Intensitatea acestei benzi (al cărei maximum este la 328 m μ) serveşte ca măsură a conţinutului în vitamină.

Metodele biologice rămân cele fundamentale, deoarece celelalte metode nu sunt absolut specifice pentru toţi compuşii posedând activitatea vitaminică A. Principiul acestei metode, numite şi „metoda curativă" de determinare a vitaminei A, e bazat pe determinarea cantităţii de vitamină necesară pentru a înlătura fenomenele de avitaminoză provocată la animale (şobolani tineri) lipsiţi în alimentaţia lor de vitamină A.

Organismul animal (om, maimuţă, cobai) nu poate sintetiza vitamina A, ci poate numai transforma provitaminele din vegetale în vitamina A. Această transformare se face în ficat sub acţiunea catalitică a unei enzime, carotinaza, care probabil scindează hidrolitic molecula carotenului cu formare de vitamină A. Pentru acţiunea carotinazei este indispensabilă prezenţa tiroxinei. Cel mai important organ de depozitare al provitaminelor A este ficatul, dar acest rol îl joacă şi plămânul şi rinichiul; acesta poate depozita cantitatea necesară pentru 6 luni, transformând-o în vitamină A după necesitate. Capacitatea de depozitare este relativ mare la animalele tinere. Pentru absorbţia vitaminei A sunt necesare prezenţa grăsimilor şi secreţia pancreatică. Turburări în absorbţia lipidelor aduc şi turburări în absorbţia vitaminei A. Astfel, în icterul prin obstrucţie, absorbţia vitaminei A este scăzută, deoarece se elimină cu lipide neabsorbite prin fecale. Pentru absorbţia provitaminelor e necesară prezenţa acizilor biliari.

Proprietăţile fiziologice ale vitaminei A sunt în funcţie de integritatea inelului β-iononic şi de prezenţa tuturor legăturilor duble la locurile lor caracteristice.

Doza zilnică indispensabilă de vitamină A este de 1—2 mg.

Serul normal conţine 20 — 50 γ%. β-carotenul a fost adoptat ca standard internaţional pentru activitatea vitaminei A, unitatea fiind 0,6 γ din produsul pur, cristalizat.

Tabelul 7

Conţinutul în vitamină A al câtorva alimente:

Uleiul de morun:	300 — 1 500 mg	‰
Ficatul de vacă:	30 — 500 mg	„
Laptele de vacă:	0,33 — 1 mg	„
Laptele de femeie:	1—2 mg	„
Gălbenuşul de ou	40 mg	„
Salata verde :	150 mg	caroten

Acţiunea fiziologică a vitaminei A. Carenţa în vitamină A produce o serie de turburări cu caracter foarte polimorf, ce se pot sistematiza după cum urmează:

a) *Turburări oculare.* α) Keratomalacia şi xeroftalmia, care constau într'o scleroză a corneei (şi ulterior o infecţie) datorită lipsei de vitamină A din alimentaţie (fig. 42). Vitamina A, administrată, înlătură aceste simptome, de unde şi denumirea de vitamină antixeroftalmică (fig. 43, 44).

β) Hemeralopia sau pierderea vederii crepusculare. Lipsa vitaminei A duce la o micşorare a percepţiei în lumina obscură (orbi de noapte), la incapacitatea de a distinge obiectele în semiobscuritate.

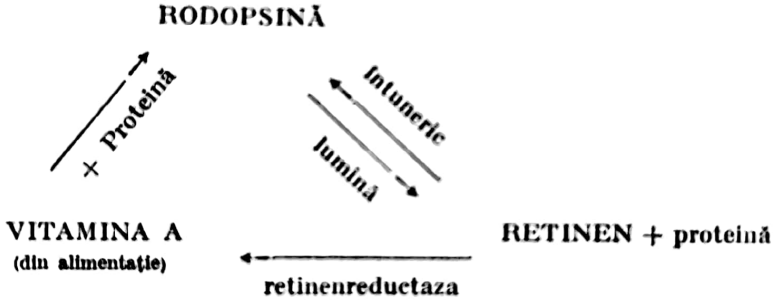
Acest lucru ar fi datorit incapacităţii de a regenera purpura vizuală în absenţa vitaminei A.

Este un fapt precis că vitamina A participă în ciclul reacţiilor chimice care intervin în funcţia vederii.

Fig. 42. Urmări ale avitaminozei A : Keratomalacie vindecată cu orbirea ochiului stâng

Vederea în lumina obscură este mediată la toate vertebratele de receptorii cunoscuți sub numele de bastonașe. Aceste bastonașe conțin un pigment roz-roșu sensibil la lumină—rodopsina sau purpura retiniană sau purpura vizuală—care poate fi extrasă cu digitonină. Rodopsina se decolorează la lumină (lungime de undă între 385 m μ—600 m μ), cu formarea unui compus intermediar colorat în portocaliu. Produsul intermediar colorat se transformă în retinen și o proteină. Retinenul este un carotenoid galben-portocaliu, care se transformă în vitamina A incoloră. Aceasta la rândul ei se poate recombina cu proteine, regenerând rodopsina. Recombinarea se face la întuneric.

Transformarea retinenului în vitamina A se face de către un sistem enzimatic retinen-reductaza, în care intervine co-enzima I redusă, retinenul fiind aldehida corespunzătoare vitaminei A care este un alcool primar. Resinteza rodopsinei necesită deci un aport de vitamină A conform schemei :



Succesiunea luminii și a întunericului transformă rodopsina în retinen și proteină.

Vitamina A este deci necesară sintezei rodopsinei și astfel se explică participarea acestei vitamine la ciclul vizual.

In resinteza vitaminei A la lumină, o proporție anumită de vitamină este pierdută, astfel că este necesar un aport exterior continuu al acesteia.

O deficiență în formarea rodopsinei, datorită unui aport insuficient de vitamină A, duce la o slăbire a acuității vizuale.

Prima fază în procesul de vedere prin care energia radiantă este transformată în impuls nervos este dată de reacția fotochimică de scindare a rodopsinei.

Testurile propuse pentru o înregistrare precoce a stării de precarență în vitamina A se raportează în special la examenele oftalmologice.

b) *Turburări cutanate* : hiperpigmentație și hiperkeratoză a pielei, deci o modificare a păturilor epiteliale.

c) *Modificări ale căilor respiratorii* printr'o epidermizare, o keratinizare a mucoasei nazale.

Fig. 43. Avitaminoza A : oftalmie avansată cu incrustaţie producând închiderea completă a ochiului.

Fig. 44. Avitaminoza A : depilare şi arie hemoragică în jurul ochiului.

d) *Turburări ale aparatului uro-genital* datorite unei keratinizări cu descuamare a epiteliilor uretero-vezicale şi uretrale. Frecvenţa calculilor renali şi vezicali este constatată în avitaminozele A.

e) *Colpokeratoza* se trădează prin prezenţa de celule keratinizate în lichidul vaginal, ceeace duce la un estru prelungit.

f) *Alterări ale organelor glandulare în general* :

a) glanda lacrimală (scade secreţia);

b) glanda sebacee;

c) glandele sudoripare;

d) scade secreţia gastrică de HCl prin acţiunea pe care o are asupra glandelor stomacale.

Toate aceste manifestări ale carenţei în vitamina A sunt în legătură cu o acţiune generală a acestei vitamine asupra epiteliilor tisulare şi asupra mucoaselor. Vitamina A are astfel un rol fundamental în păstrarea funcţiilor normale ale epiteliilor şi mucoaselor şi datorită acestei acţiuni are şi efect antiinfecţios. Deficienţa de vitamină A determină modificări la nivelul epiteliilor gingivale, favorizând infecţiile (pioreea).

Scăderea vitaminei A produce o modificare a echilibrului mineral din sânge (P, Ca, Mg, K scad). Scad bazele purinice care ştim că sunt necesare structurii nucleului. In afară de stările de carenţă datorite unui aport exterior insuficient de provitamină sau vitamina A, se pot produce turburări de acelaş tip datorită unei alteraţii gastro-intestinale care să aibă drept consecinţă o defectuoasă absorbţie a vitaminei A sau datorită unei afecţiuni hepatice care să ducă la incapacitatea ficatului de a transforma provitamina în vitamina A.

Aportul excesiv de vitamină A produce fenomene de hipervitaminoză cu efecte care amintesc pe acelea ale hipovitaminozei. Organismul are nevoie de o anumită cantitate de vitamină A pentru menţinerea echilibrului funcţional normal. Necesitatea zilnică este de 5 000—6 000 unităţi

internaţionale (1 g = 33 000 unităţi internaţionale). Ar exista o acţiune antagonistă între vitamina A şi hormonul tiroidian.

Mecanismul de acţiune al vitaminei A nu este complect lămurit. Se pare că ar avea un rol important în oxidările celulare şi în special în cele din ficat. In mecanismul vederii am văzut că ar participa la formarea purpurei retiniene (rodopsina), sub forma unei combinaţii cu o proteină, combinaţie care sub acţiunea luminii s'ar desface eliberând din nou vitamina A, dar cu anumite pierderi care trebue mereu înlocuite prin aport exterior. Retina este unul din organele cele mai bogate în vitamina A.

O altă vitamină A, notată A_2, ar fi prezentă la peştii de apă dulce. Aceasta ar diferi de vitamina A prin prezenţa unei grupări CH_3 adiţională şi o altă legătură dublă conjugată. Unele organisme marine unicelulare ar sintetiza vitamina A.

Vitaminele D

Vitaminele D fac parte din grupa vitaminelor liposolubile. Există mai multe vitamine D, notate dela 1—6, cu structură chimică şi acţiune fiziologică analoagă. Rolul specific al acestor vitamine constă în prevenirea şi vindecarea rahitismului; sunt astfel integrate în metabolismul calciului şi al fosforului. Din punct de vedere chimic vom vedea că sunt derivaţi de steroli. In organismul animal rezultă din provitaminele corespunzătoare aduse de alimentaţia vegetală, sub acţiunea radiaţiilor ultraviolete. Transformarea provitaminelor D în vitaminele corespunzătoare nu se face printr'o scindare hidrolitică (ca în cazul vitaminei A), ci printr'o profundă modificare structurală. Vitaminele D nu mai precipită cu digitonina, spre deosebire de provitaminele corespunzătoare care precipită, astfel că provitaminele D şi vitaminele D sunt izomere între ele. Dintre toate vitaminele D, cea mai activă este vitamina D_2. Vom începe deci cu această vitamină (vezi formulele).

Vitamina D_2 sau calciferolul.

Provitamina vitaminei D_2 este ergosterolul $C_{28}H_{44}O$, sterolul vegetal izolat dintr'o ciupercă a bobului de secară (*Clavices purpureea*).

Ergosterolul, ca şi colesterolul, conţine nucleii A, B, C, D din ciclul sterolilor; diferă de acesta prin prezenţa a două legături duble suplimentare, una în nucleu şi cealaltă în catena laterală, unde conţine 9 carboni în loc de 8 ca în colesterol.

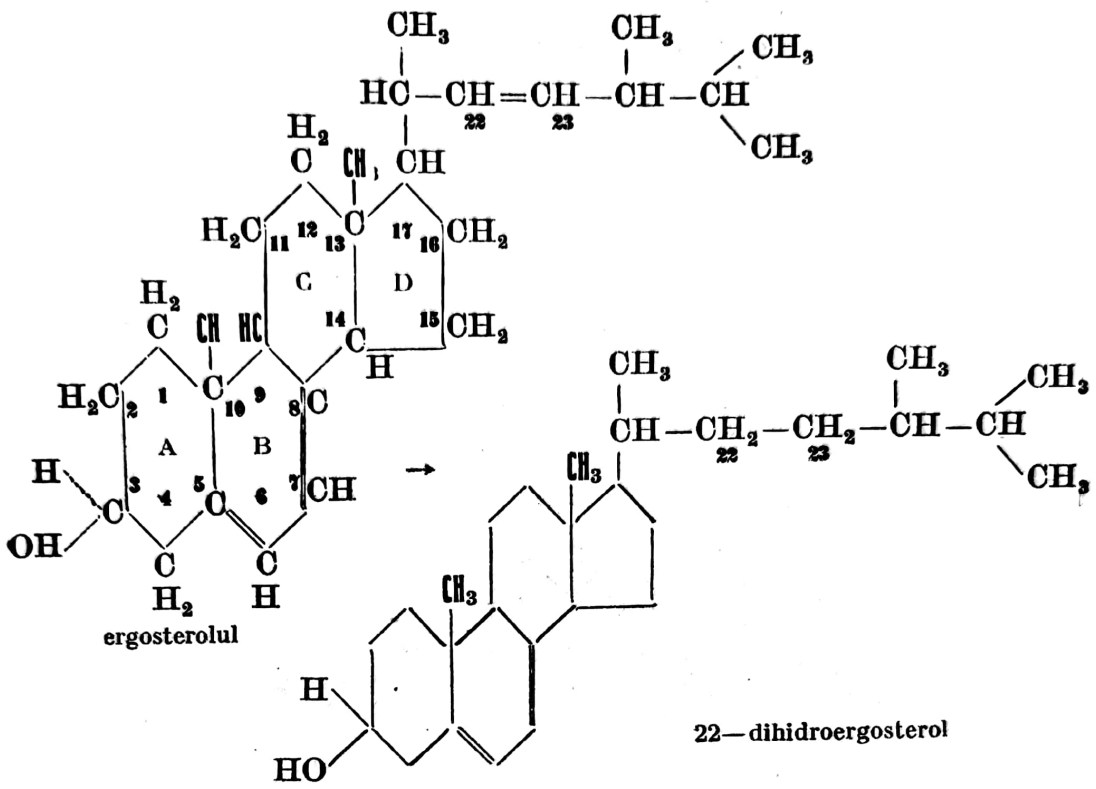
Din acest compus, prin iradiere cu raze ultraviolete, rezultă vitamina D_2, un compus, uleios vîscos, cu acţiune antirahitică puternică.

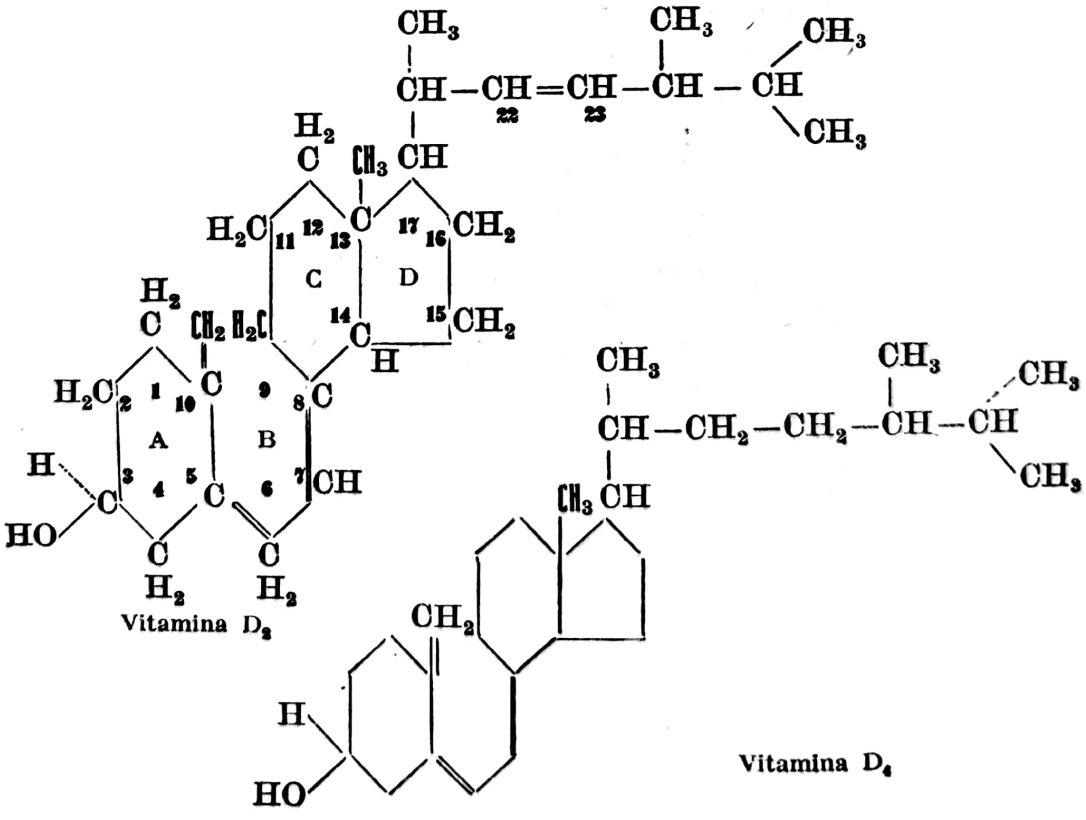
Transformarea se face in „vitro", cât şi in „vivo".

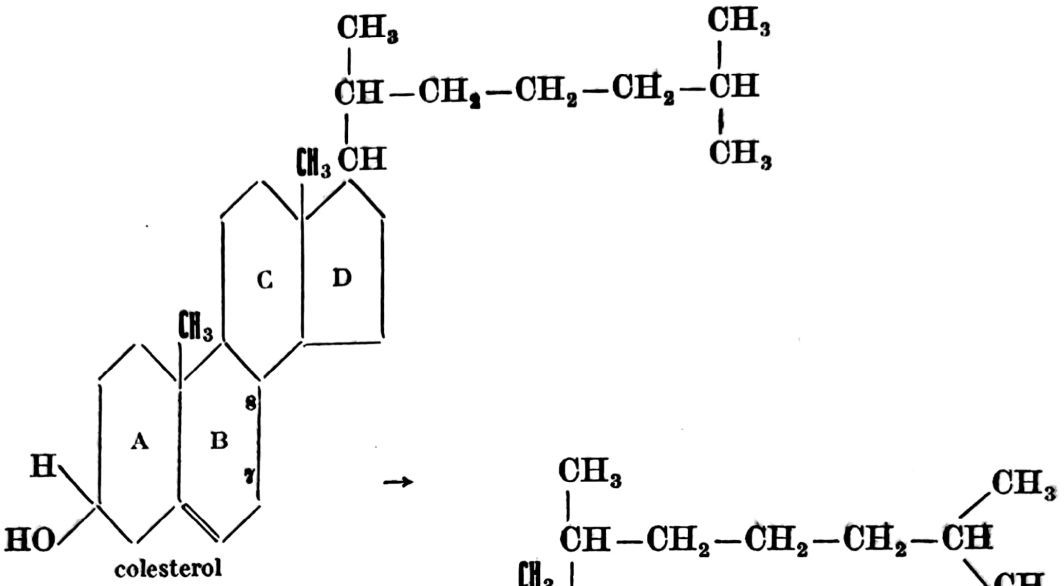
Ergosterolul este acumulat în zonele superficiale ale dermului, unde sub acţiunea razelor ultraviolete (lumina solară) se transformă în vitamină D_2 (astfel se explică efectul favorabil al helioterapiei în rahitism).

Sinteza vitaminei D_2 din ergosterol sub acţiunea radiaţiilor ultraviolete este în funcţie de energia absorbită şi se realizează sub acţiunea radiaţiilor de lungime de undă cuprinse între 256—313 mμ:

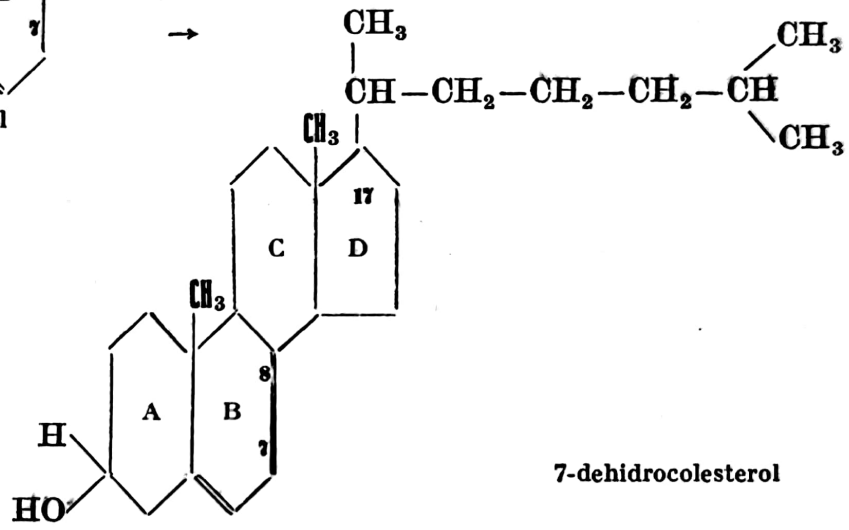
Vitaminele D



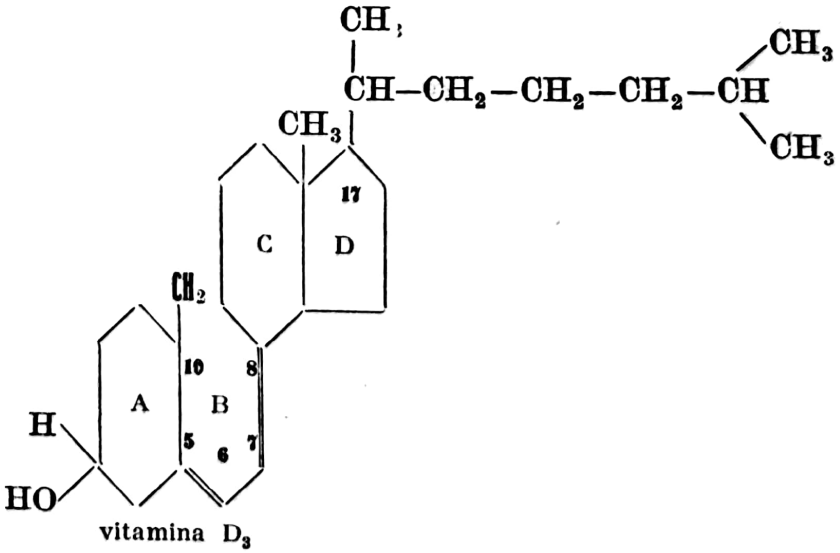




colesterol



7-dehidrocolesterol



vitamina D_3

cu un maxim la 298 mμ (1μ = 0,001 mm; 1 m μ = 0,001 μ; 1 Å = 0,1 mμ). Razele ultraviolete au deci o acțiune antirahitică la o lungime de undă la care absorbția de către provitamină este maximă. Activarea ergosterolului sub acțiunea razelor ultraviolete nu este o transformare directă a acestuia în vitamina D_2, ci se formează o serie de produse intermediare izomere între ele, care diferă prin spectrul lor de absorbție și prin acțiunea lor fiziologică. Prin suprairadierea vitaminei D_2 se obțin o serie de produse toxice. Succesiunea diverselor produse izomere de transformare a ergosterolului sub acțiunea radiațiilor ultraviolete este următoarea:

ergosterol → lumisterol → tahisterol → vitamina D_2 (calciferol)
(provitamina D_2)

suprasterol I—suprasterol II—toxisterol

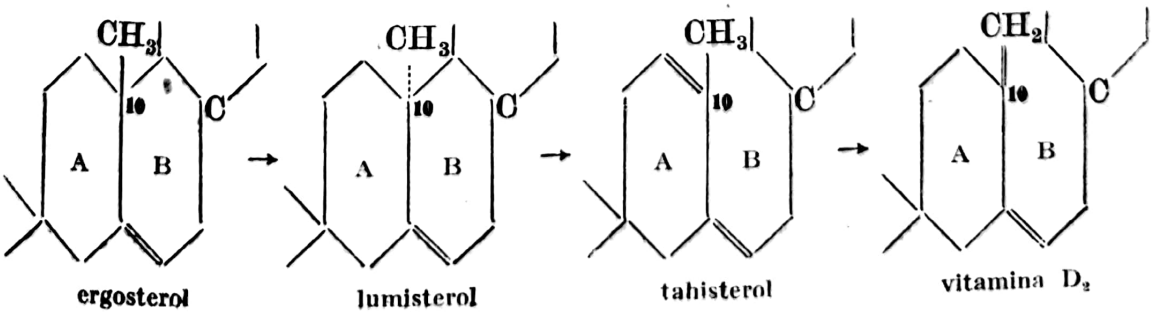
Acțiunea radiațiilor ultraviolete asupra ergosterolului depinde de lungimea de undă a radiațiilor, de durată, de prezența oxigenului și duce la următoarele transformări chimice, corespunzătoare compușilor de mai sus:

1. Reacția fotochimică începe la C_{10} din ciclul A al cărui substituent CH_3 este deplasat în raport cu planul moleculei în poziție „trans" din poziția „cis" inițială. Rezultă în felul acesta produsul intermediar *lumisterolul*, care are aceeași formulă ca și ergosterolul, conține cele patru cicluri intacte, are însă gruparea metilică dela C_{10} în poziție „trans" în loc de „cis" și nu mai precipită cu digitonina (reacția caracteristică sterolilor devine astfel negativă).

2. Acțiunea următoare este o deschidere a ciclului B între C_{10} și C_9, cu formarea unei legături duble între C_{10} și C_1. Rezultă compusul izomer tahisterolul, compus cu ciclul B deschis și cu patru duble legături conjugate (3 în cicluri). Nu are acțiune antirahitică, dar are proprietatea de a mări concentrația calciului sanguin. Produsul său de hidrogenare, dihidrotahisterolul, este de zece ori mai activ și este cunoscut în comerț sub numele de AT_{10} (sau compusul antitetanic nr. 10).

3. Iradierea mai departe a tahisterolului duce la o deplasare a legăturii duble din ciclul A (legătură dublă între C_{10}—C_1); între C_{10} și C grupării metilice substituită la C_{10} are loc o transformare a grupării metilice în grupare metilenică = CH_2. Compusul astfel rezultat este vitamina D_2 sau calciferolul, singurul cu acțiune antirahitică din această serie de compuși intermediari.

Din punct de vedere chimic, vitamina D_2 se deosebește deci de provitamina sa, ergosterolul, prin prezența ciclului deschis B între C_9—C_{10} și prezența unei a patra legături duble între C_{10} și CH_2 vecin:



Suprairadierea vitaminei D_2 duce la o serie de compuşi fără activitate antirahitică, dar cu activitate toxică, şi anume toxisterolul şi suprasterolul I şi II.

In 1942 s'a reuşit sinteza vitaminei D_2 pornind dela o aldehidă nesaturată.

Proprietăţile fizice şi chimice ale vitaminei D_2. Este insolubilă în apă, solubilă în solvenţi organici ai grăsimilor. Relativ stabilă la încălzire şi la acţiunea oxigenului. Este distrusă numai la 180°; în mediu acid e mai labilă, în mediu alcalin mult mai stabilă. Nu precipită cu digitonina. Este optic activă.

Metodele de determinare a vitaminei D_2 *sunt metode chimice, fizice şi metode biologice. Metodele chimice şi fizice* sunt mai complicate şi nu duc la rezultate absolut concludente, unele din ele interferând cu forma inactivă a vitaminei şi cu reacţiile de culoare pentru vitamina A. Dă o coloraţie violetă cu clorura de antimoniu după tratare cu pirogalol. Se aplică şi o metodă cromatografică selectivă. Metodele fizice sunt spectrofotometrice.

Metodele biologice sunt mai precise. Se determină cantitatea necesară pentru a vindeca rahitismul provocat la guzgani, după o dietă adecvată, comparativ cu un preparat standard de vitamină D.

Surse de vitamină D_2 pentru om sunt laptele, untul şi în special untura de peşte, care are 200 unităţi pe gram. Necesitatea zilnică pentru adult este de ~ 400 unităţi, pentru copii 600—700 unităţi.

Vitamina D_1

Este de fapt un amestec de vitamină D_2 cu lumisterol în proporţii echimoleculare (1/1).

Vitamina D_3 C_{27} H_{43} OH.

Multă vreme confundată cu vitamina D_2, este singura vitamină care există ca atare în natură (nu numai sub formă de provitamină). Este vitamina D produsă prin iradierea pielei, laptelui; în levuri se obţine prin iradierea ergosterolului. Rezultă însă şi prin iradierea 7-dehidrocolesterolului. Se deosebeşte de 7-dehidrocolesterol printr'un ciclu B deschis şi prin prezenţa a trei duble legături : (5,6) (7,8) şi la C (10) legătura $= CH_2$, iar de vitamina D_2 prin lipsa unui CH_3 la C_{24} din catena laterală, precum şi a unei duble legături în catena laterală între C_{22} şi C_{23} (vezi formulele).

7-dehidrocolesterolul diferă de colesterol numai printr'o dublă legătură în plus (7,8).

Vitamina D_4

Are ca provitamină 22-dihidroergosterolul. Acesta nu mai conţine nici el legătura dublă în catena laterală ($C_{22}—C_{23}$), singura deosebire faţă de vitamina D_2. Este mai puţin activă decât vitaminele D_2 şi D_3.

Vitamina D_5

Are ca provitamină 7-dehidrositosterolul, din care se obţine prin iradiere. Nu are legături duble în catena laterală şi are substituit la C_{24} în loc de gruparea metilică — CH_3 gruparea etilică — C_2H_5.

Scanned with OKEN Scanner

Vitamina D_6

Are ca provitamină 7-dehidrostigmasterolul.

In rezumat, toate vitaminele D sunt derivaţi de steroli şi au acţiune antirahitică. Se deosebesc mult între ele însă prin intensitatea acestei acţiuni şi prin acţiunea lor asupra diverselor animale (pui de găină, guzgani, etc.). Astfel, vitamina D_2 are acţiune identică aproape cu vitamina D_3 asupra guzganilor, dar de o mie de ori mai mică asupra puilor de găină.

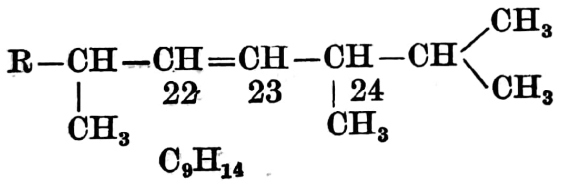
Relaţia dintre structura chimică şi activitatea biologică. Din punct de vedere chimic, vitaminele D au la origină acelaş complex ciclic A, B, C şi D al sterolilor; orice modificare a acestui ciclu face imposibilă transformarea provitaminelor în vitaminele corespunzătoare.

Importantă este prezenţa legăturii duble la ciclul B între C_8 şi C_7. Sterolii fără această legătură dublă, de exemplu colesterolul, nu pot funcţiona ca provitamină; numai compusul său de dehidrogenare 7-dehidrocolesterolul, care are în această poziţie legătură dublă, constitue o provitamină.

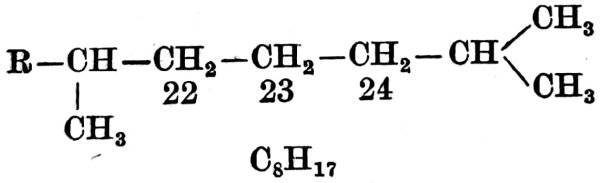
Activitatea vitaminică este legată de existenţa a trei legături duble conjugate la inelul deschis, B, iar intensitatea acţiunii vitaminice e legată de structura catenei laterale.

Intr'adevăr, diversele vitamine D au cicluri identice, dar catene laterale diferite:

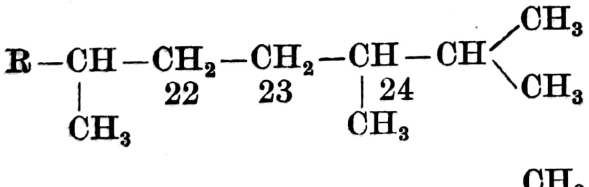
PROVITAMINE

1) 

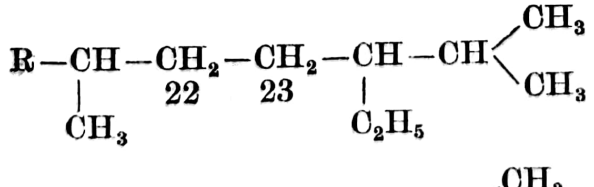
Vitamina D_2
(ergosterolul) (catena laterală a ergosterolului)

2) 

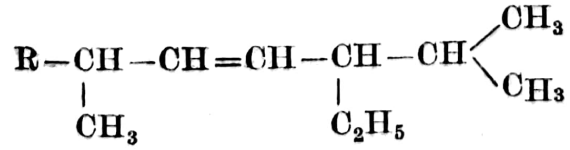
Vitamina D_3
(catena laterală a 7-dehidrocolesterolului)

3) 

Vitamina D_4
(catena laterală a 22-dihidroergosterolului)

4) 

Vitamina D_5
(catena laterală a dehidro —? sitosterolului)

5) 

Vitamina D_6
(catena laterală a 7 dehidrostigmasterolului)

Vitaminele D au catenele laterale ale provitaminelor respective, din care rezultă prin deschiderea ciclului B.

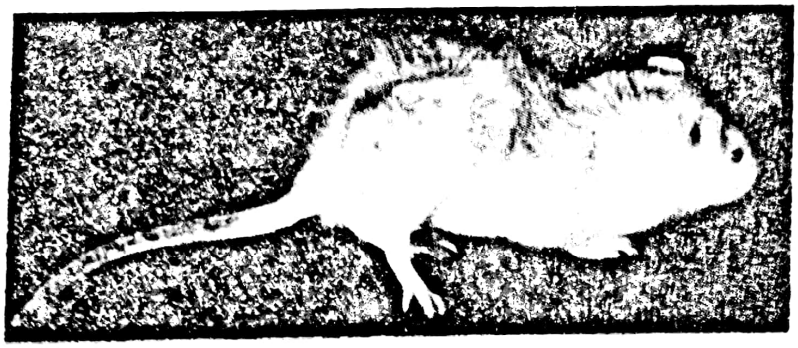
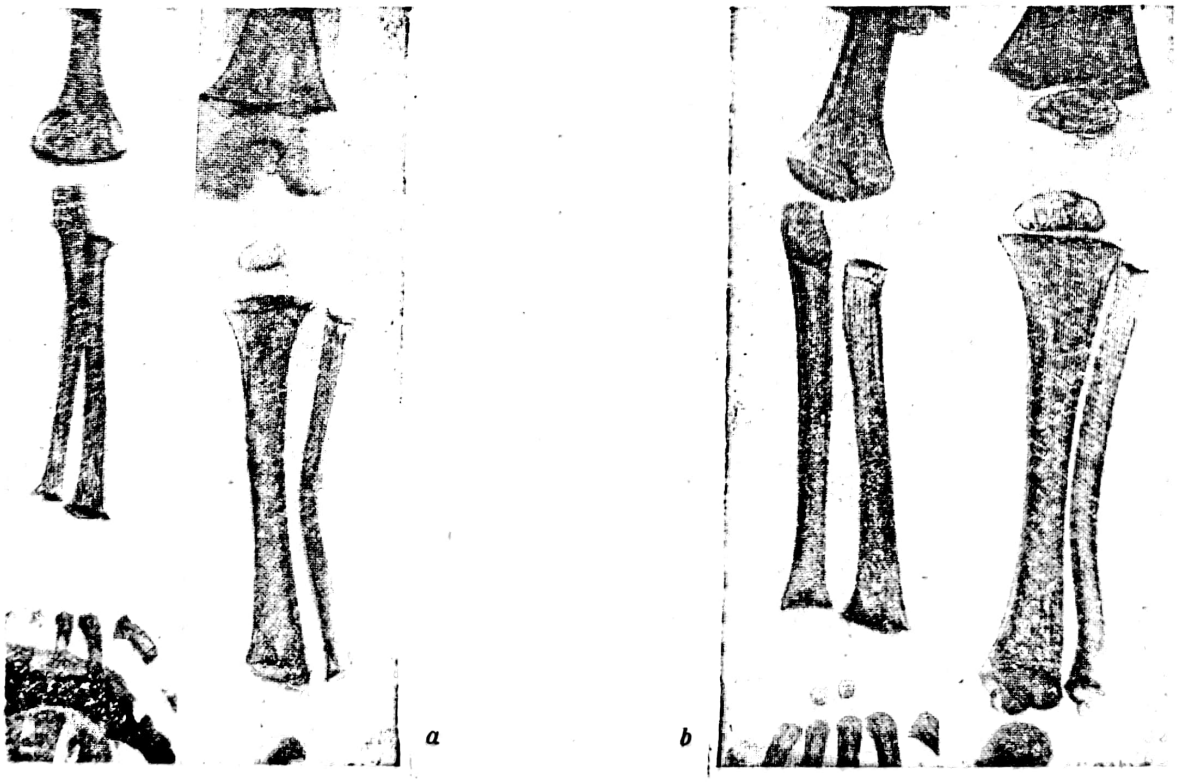


Fig. 45. Rahitism la şobolan

Depozitarea vitaminei D. Organismul animal poate depozita vitamina D, cantitatea fiind în funcţie de aportul alimentar şi de intensitatea influenţei radiaţiilor ultraviolete asupra procesului de sinteză. Ea poate fi depozitată în diverse organe : creier, suprarenale, timus, ficat, rinichi, piele. Pielea conţine provitaminele, care prin iradiere trec în vitamine.

Acţiunea fiziologică a vitaminelor D. Carenţa în vitamina D provoacă la copii simptomele bolii cunoscute sub numele de rahitism. Aceasta a fost reprodusă experimental la şobolani hrăniţi cu un regim lipsit de vitamina D, ceeace a permis un studiu amănunţit al acestei boli (fig. 45). Principalul simptom al acestei avitaminoze este o insuficientă depunere a fosfatului de calciu în oase şi, cum s'a dovedit în ultimul timp, şi în dinţi. Vitamina D are un rol predominant în absorbţia intestinală a calciului, în asimilarea, fixarea şi mobilizarea lui.



a) Modificări rahitice grave : decalcificare, curbare a oaselor, zona de osificare encondrală fibrilară.
b) După 3 luni de tratament cu vit. D.

Fig. 46. Rahitism la copil. Oasele mâinii şi ale piciorului înainte şi după tratament cu vitamina D.

In general, rahiticii au hipocalcemie și hipofosfatemie. Calcemia copilului normal e între 10,8 — 11,3 mg%, a rahiticilor poate atinge 9 mg%, deci puțin scăzut. P normal 6—7 mg%, la rahiticilor mult scăzut, 3 mg%.

In oase, Ca normal între 15,5—18,1 poate scădea la 3-12, iar P dela 5,4-8,3 la 1,4—5,6; oasele rahitice sunt caracterizate printr'un conținut mult mai mic, avitaminoza D fiind caracterizată tocmai printr'o scădere a retenției de Ca și P (fig. 46,47).

Asimilarea Ca nu depinde de aportul lui exterior, ci de valoarea raportului Ca/P din rația alimentară, deoarece eliminarea Ca se face aproape totdeauna concomitent cu a P (sub formă de fosfat de Ca).

Fig. 47. Câine cu rahitism provocat printr'o alimentație deficientă în vitamina D.

Rolul vitaminei D este tocmai de a restabili desechilibrul provocat de un regim fosfocalcic desechilibrat, prin acțiunea pe care o are asupra absorbției Ca (fig. 48) și P, în special la nivelul intestinului subțire. Se presupune că vitamina D ar mări secreția gastrică și ar favoriza astfel absorbția Ca și P.

Asimilarea calciului depinde și de forma sub care este dat; astfel, recalcificarea organelor sărace în calciu se face mai activ din compușii organici ai acestuia. In fenomenul de osificare, care se știe că se face pe seama calciului din plasma sanguină, intervine ca agent important *fosfataza*, o enzimă hidrolitică care catalizează reacția de scindare a esterilor fosforici cu eliberare de radical fosforic. Această enzimă se găsește în toate organele, dar în special în oase și dinți. In rahitism, cantitatea de fosfatază din sânge, în genere mică, e mult crescută și, paralel, are loc o creștere a eliminării de acid fosforic și deci de calciu sub formă de fosfat. Creșterea fosfatazei în sânge în rahitism ar fi probabil datorită unei difuziuni a acesteia din țesutul osos (fosfataza este în special acumulată în centrele de osificare ale cartilajelor). In formarea oaselor ar interveni două mecanisme, unul

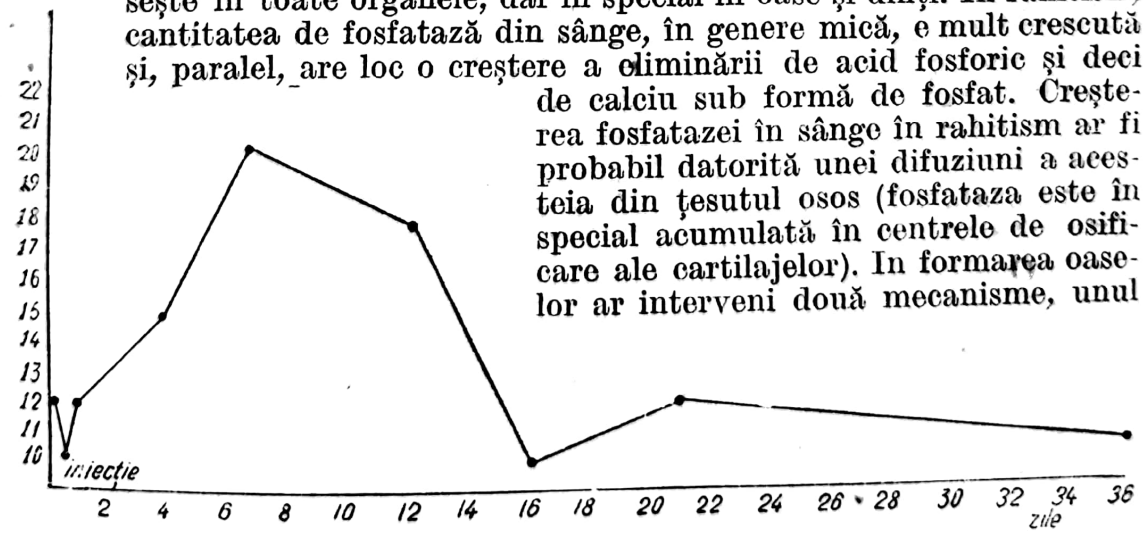


Fig. 48. Curba calcemiei la un câine după administrare intravenoasă de ergosterol timp de 4 ore.

datorit intervenției fosfatazelor care ar stimula producerea de radical fosforic cu formarea de fosfat de calciu și un al doilea mecanism pur fizic de depozitare a fosfatului de calciu din soluția suprasaturată.

Vom vedea acest lucru mai în detaliu la mecanismul osificării. Vitamina D ar avea rolul să crească capacitatea de absorbție a acestor două componente, Ca și P, necesare procesului de calcificare. Aportul insuficient de vitamină D provoacă la adult *osteomalacia*, caracterizată printr'o decalcificare cu deformare a oaselor. O creștere a calciului sanguin printr'o disolvare a acestuia din oase duce la această afecțiune în care intervine activ în afară de vitamina D și paratiroida (hormonul paratiroidian).

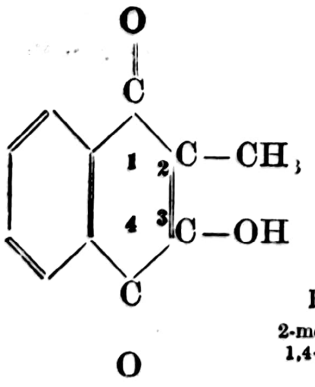
Hipervitaminoza D. O supradozare excesivă de vitamină D (150 000 unități internaționale pt. 1 kg), de câteva sute de ori doza terapeutică necesară, poate duce după unii autori la o serie de turburări cunoscute sub numele de hipervitaminoză D.

Simptomele importante ale intoxicării provocate astfel sunt poliuria și anorexia. Cresc calciul și fosforul în sânge și are loc o calcificare a țesuturilor moi și în special ale arteriolelor renale și aortei. Efectul toxic dispare la întreruperea aportului excesiv. (După alți autori, aceste fenomene ar fi datorite impurităților).

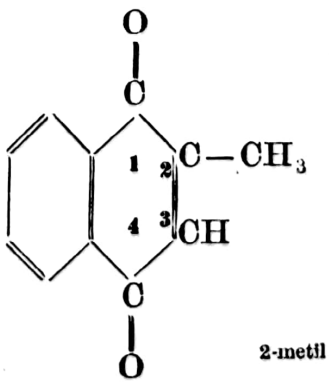
Determinarea precarenței în vitamină D se poate face prin determinarea fosfatazei sanguine. Simptomul acesta apare cel mai devreme și dispare cel mai rapid. Necesitatea în vitamină D la om este în funcție de vârstă, culoarea pielei, etc. Doza zilnică necesară ar fi de 400 unități și de 700 unități în primii ani ai copilăriei. Unitatea de vitamină D este egală cu 0,025 micrograme (γ) vitamină D_2 cristalizată.

Vitamina K

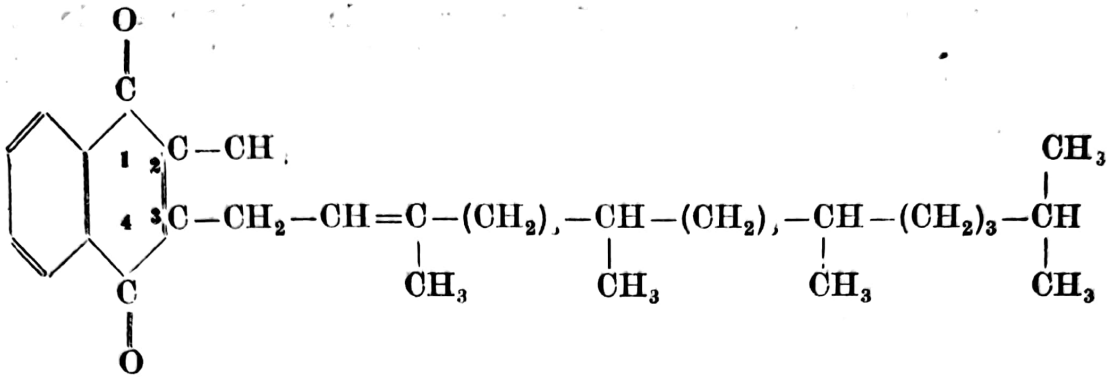
Vitamina K sau vitamina de coagulare sau vitamina antihemoragică face parte din grupa vitaminelor liposolubile. Carența în această vitamină produce la animale o stare hemoragică prin scăderea capacității de coagulare a sângelui. Există mai multe substanțe naturale cu activitate fiziologică analoagă, și anume : factorul K izolat din lucernă, factorul K_2 izolat din pulbere uscată de pește în putrefacție (datorită deci putrefacției bacteriene). Din punct de vedere chimic, vitaminele K au structură chinoidă, sunt *derivați de naftochinonă* (*2-metil-1—4-naftochinonă*) la care, în vitamina K, este *substituit la C_3 radicalul fitol.* Formula sa a fost stabilită prin analogie de structură cu *ftiocolul* (izolat din pigmentul bacilului tuberculos), care are o slabă acțiune de vitamină K. Vitamina K este astfel *2-metil-3-fitil-1—4-naftochinonă* $C_{31}H_{46}O_2$. Se mai numește și fitochinonă:



Ftiocolul
2-metil -3-hidroxi—1,4-naftochinona



2-metil 1-4—naftochinonă



vitamina K_1

Vitamina K_2 conține o catenă laterală similară dar mai lungă (C_1 H_5 O_2). Vitamina K_1 este un lichid galben vîscos; vitamina K_2 e solidă, cristalizată. Sunt sensibile la lumină. Acțiunea fiziologică a vitaminei K este condiționată de prezența inelului chinonic; catena laterală nu este esențială — substituția în poziția 3 nu slăbește mult activitatea vitaminică.

Acțiunea fiziologică a vitaminei K *ar consta într'o activare directă a protrombinei sanguine,* factorul determinant în procesul de coagulare sanguină. Diateza hemoragică constatată în carența de vitamină K este datorită unei scăderi a nivelului protrombinei sanguine. Protrombina sau profermentul, în prezența chimoplastinei și a calciului, dă naștere trombinei, enzima care provoacă transformarea fibrinogenului (solubil) în fibrină (insolubilă). (Determinarea vitaminei K este bazată pe determinarea protrombinei).

Este probabil că *intervine în sinteza protrombinei prin intermediul unui sistem enzimatic, sinteză care probabil are loc în ficat.* Pentru absorbția vitaminei este necesară prezența bilei, deaceea în insuficiențele hepatice și obstrucțiile biliare există o deficiență protrombinică. Obstrucțiile biliare fiind adesea întovărășite de hemoragii, utilizarea vitaminei K în diversele afecțiuni hepatice cu stări hemoragice dă rezultate bune.

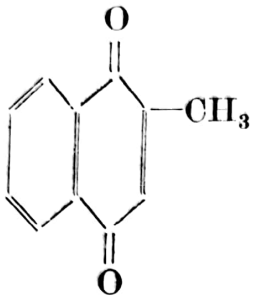
La om, carența în vitamina K nu este rezultatul unei deficiențe alimentare, deoarece vitamina există în multe alimente și în afară de aceasta este sintetizată de bacteriile intestinale (în special din grupa coli) și apoi eliberată prin desintegrarea prin putrefacție a celulei bacteriene. Carența ei la om este provocată în special prin lipsă de absorbție, datorită lipsei de bilă necesară, deaceea deficiența de vitamină K apare în turburările gastro-intestinale, în afecțiuni hepatice, biliare.

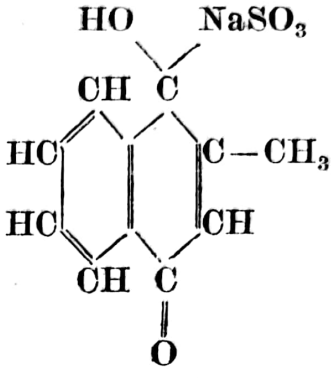
Sângele animalelor în avitaminoza K este caracterizat printr'un deficit în protrombină, ceeace explică întârzierea timpului de coagulare.

Diagnosticul de avitaminoză K e bazat tocmai pe determinarea timpului minim de coagulare a sângelui.

Am spus că activitatea vitaminei K este legată de prezența ciclului chinoidic, lucru dovedit prin aceea că o serie de preparate sintetice conținând acest ciclu sunt active, de exemplu preparatul obținut de A. Palladin, „Vicesol", derivat bisulfitic al metilnaftochinonei. Un alt compus sintetic, *menadiona,* 2-metil-1—4-naftochinona, este deasemenea activ.

După A. Palladin, vitamina K sau produsele analoage ar lucra nu numai asupra protrombinei, ci şi asupra ţesuturilor endoteliale, asupra endoteliilor capilare şi asupra fibrinogenului care intervine în coagulare.

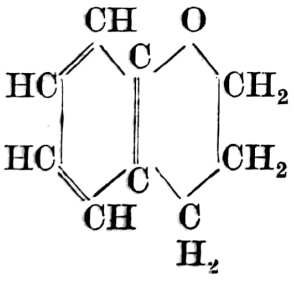




Vicesol

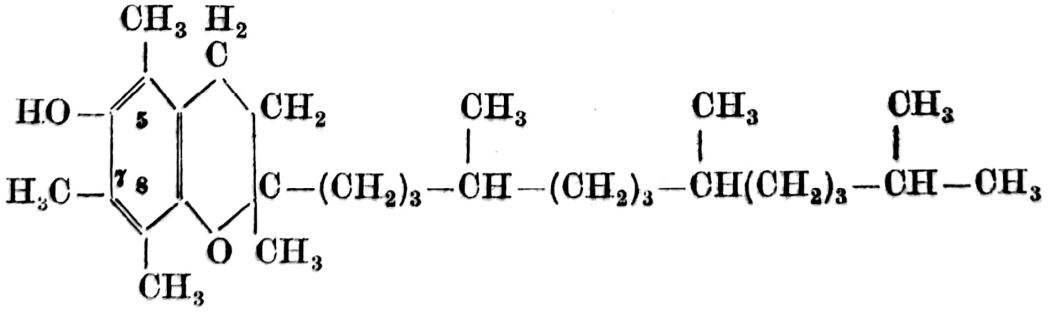
Vitamina E

Este a treia vitamină liposolubilă. Este solubilă în alcool metilic şi etilic, acetonă; este insolubilă în apă. Mai are şi numele de vitamina „fertilităţii", deoarece absenţa ei din alimentaţia şobolanilor duce la sterilitate, la şobolanii masculi prin întreruperea spermatogenezei, la femele prin întârzierea desvoltării embrionului. Leziunile cele mai frecvente în avitaminoza E sunt necroze ale muşchilor striaţi, uneori leziuni ale sistemului vascular. Mai are şi numele de „tocoferol".



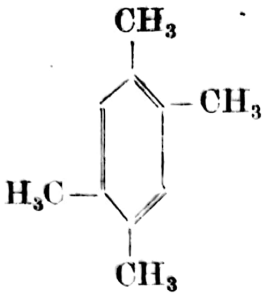
croman

Compoziţie chimică. Are formula brută $C_{29}H_{50}O_2$. Este un derivat de croman. Este un alcool, un compus heterociclic cu oxigen în ciclu. Este format dintr'un nucleu *benzenic substituit, dintr'un ciclu hexagonal oxigenat* şi *o catenă laterală cu 16 carboni analoagă fitolului.* Există în natură sub trei forme: α-, β-, şi γ-tocoferolul. β- şi γ-tocoferolul diferă de α-tocoferol prin aceea că nu au gruparea metil în nucleul aromatic în poziţia 7 şi respectiv poziţia 5.

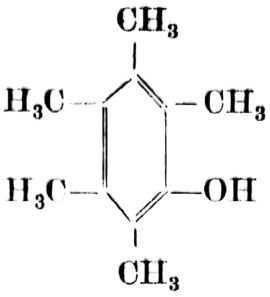


α-tocoferol (vitamina E)

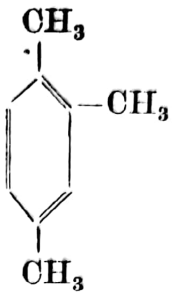
$C_{29}H_{50}O_2$



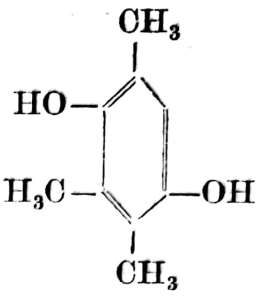
durol



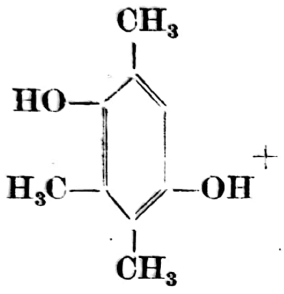
durohidrochinona



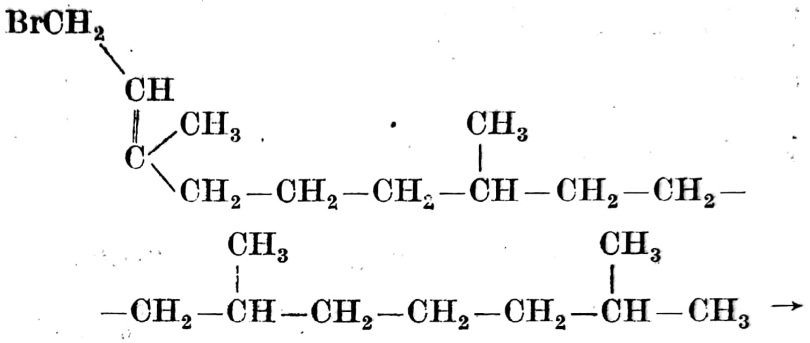
pseudocumol



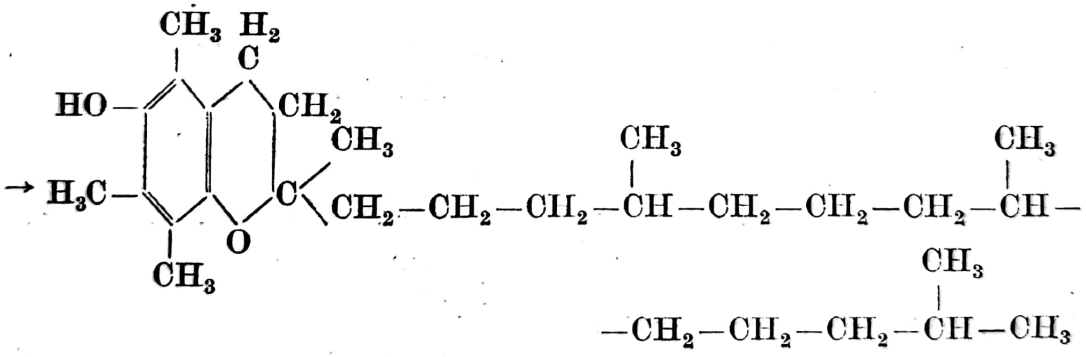
pseudocumolhidrochinonă



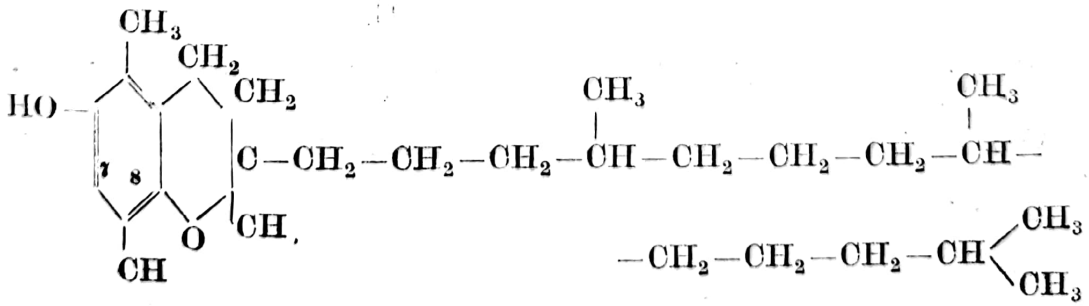
pseudocumolhidrochinonă +



bromură de fitil



α-tocoferol ($C_{29}H_{50}O_2$)



β-tocoferol ($C_{28}H_{48}O_2$)

Cele trei forme au fost izolate din plante prin procedee destul de complicate.

Prin scindare termică, tocoferolul duce la o hidrochinonă substituită, tetrametilhidrochinonă.

A fost sintetizată, pornind chiar dela o chinonă substituită pseudocumolhidrochinona (trimetilhidrochinona) şi din bromura de fitil (vezi formulele de mai sus). Datorită prezenţei oxidrilului fenolic în molecula vitaminei E, ea este un antioxidant puternic pentru grăsimi. Prezenţa grupării OH fenolice libere sau esterificate de un acid organic este indispensabilă pentru activitatea sa. Activitatea biologică a tocoferolului este atenuată prin scurtarea catenei laterale, prin modificarea numărului grupărilor metilice din nucleul aromatic, prin substituirea în acest nucleu de grupări etilice în loc de metilice, prin înlăturarea grupării OH. Absorbţia vitaminei E este legată de aceea a lipidelor, ca şi pentru vitaminele D şi K; pentru absorbţia ei este necesară prezenţa bilei în intestin. Vitamina E este foarte răspândită în natură; surse de mare importanţă sunt seminţele cerealelor, legumele verzi, frunzele vezi. In seminţele uleioase apare

Tabelul 8

Vitamina E, exprimată în unităţi internaţionale are următoarele valori:

1 g de acetat de α-tocoferol	=	1 000 unităţi internaţionale
1 g α-tocoferol	=	400 unităţi şobolan
1 g β-tocoferol	=	200 „ „
1 g γ-tocoferol	=	200 „ „

sub forma celor trei tocoferoli α, β şi γ, proporţia variind cu diversele plante.

Determinarea chimică a vitaminei E este bazată pe oxidarea acesteia şi se face pe cale spectroscopică, după oxidare. (v. tabelul 8).

Vitamina F

Vitamina F nu este propriu zis o vitamină; acest nume a fost dat unor serii de acizi graşi, a căror lipsă din alimentaţie duce la o avitaminoză specială, care dispare prin aport de acizi graşi nesaturaţi (linolic, linolenic, arahidonic, clupanodonic). Denumirea de vitamină dată acestor compuşi nu este acceptată de toată lumea ştiinţifică, deoarece ar trebui, ca urmare a acestui caz, să se dea tuturor compuşilor indispensabili, deci şi unor aminoacizi, tot numele de vitamină.

VITAMINELE HIDROSOLUBILE

Din grupa vitaminelor hidrosolubile fac parte: grupa vitaminelor B (complexul vitaminic „B"); vitamina C, vitamina P.

Vom studia fiecare grup în parte, începând cu grupa vitaminelor B.

Vitaminele B

Se credea la început că există o singură vitamină B (1912). Cercetările ulterioare au permis izolarea şi identificarea unei întregi serii de vitamine care au trebuit să fie clasificate în grupa vitaminelor B, con-

stituind aşa zisul „complex vitaminic" B. Se clasează în grupa acestui complex următoarele vitamine:

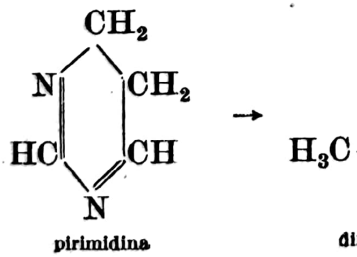
1. *vitamina* B_1 sau *aneurina* sau *tiamina*,
2. *vitamina* B_2 sau *riboflavina* (lacto-ovo-hepatoflavina);
3. *vitaminele* B_3, B_4, B_5, neidentificate din punct de vedere chimic;
4. *vitamina PP* sau *niacina* (factor antipelagros uman, acid nicotinic);
5. *vitamina* B_6 sau *piridoxina* (sau adermina, factor y; factor 1; factor eluat);
6. *acidul pantotenic*;
7. *vitamina* B_7 (vitamina I), neidentificată chimic;
8. *vitamina* B_8 (acidul adenilic?);
9. *vitamina* B_{12};
10. *acidul folic* sau acidul pteroilglutamic;
11. *vitamina H* sau *biotina* (coenzima R, bios II, vitamina B_w);
12. *vitamina* L_1 şi L_2 (factori de lactaţie), neidentificate;
13. *vitamina* B_x (acidul paraaminobenzoic);
14. *bios I* (inozitolul).

Vom descrie pe fiecare în parte în măsura în care se cunoaşte structura lor chimică.

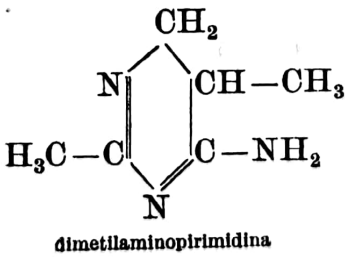
Vitamina B_1.

Numirea dată în 1947 este aceea de tiamină. Inainte se numea şi vitamină antineuritică sau aneurina — şi vitamina antiberi-beri. Previne şi vindecă boala de carenţă la om cunoscută sub numele de ***beri-beri*** (frecventă în Sudul Asiei) şi *polinevrita aviară*.

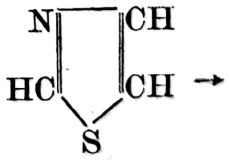
Constituţia chimică a tiaminei. Vitamina B_1 are formula brută $C_{12}H_{16}N_4OS$. Este un derivat de pirimidină şi de tiazol. Are în moleculă un heterociclu hexagonal cu doi atomi de N în ciclu (ciclul pirimidinic) şi un heterociclu pentagonal cu un N şi un S în ciclu (ciclul tiazolic). La ciclul pirimidinic sunt substituiţi un radical metil şi o grupare aminică, la cel tiazolic, un radical oxidrilic şi un radical metilic. Din aceste două cicluri se obţine produsul cristalizat sub formă de diclorură şi anume un *tiaminohidroclorid* cristalizat ($C_{12}H_{18}N_4OSCl$):



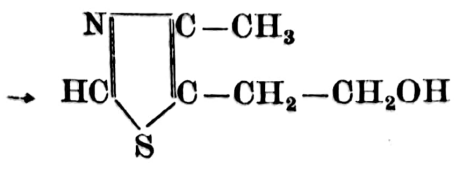
pirimidina



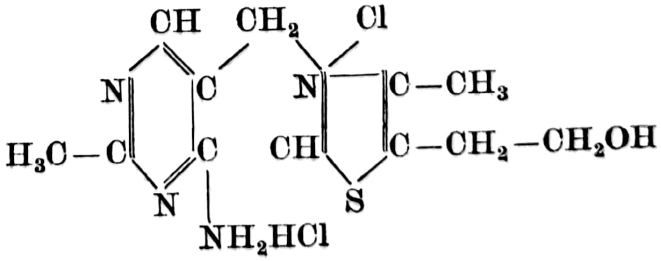
dimetilaminopirimidina



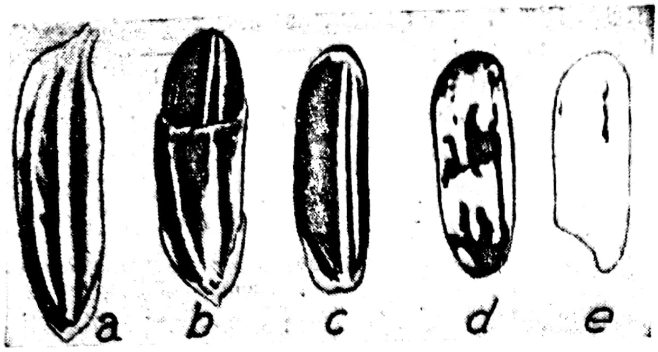
tiazol



metil-oxietil-tiazol



tiamina (vitamina B_1)
(clorhidrat de tiamină)

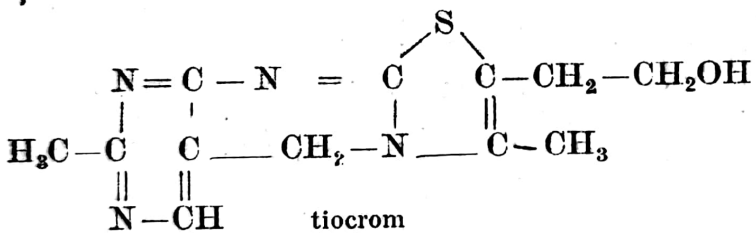


a – bob de orez cu coajă
b – jumătate din coajă decorticată;
c – coaja complect îndepărtată; bobul păstrează pericarpul și embrionul; conține 250 γ vitamina B_1
d și *e* – bobul de orez cu pelicula argintie îndepărtată.
d) conține 160 γ vitamină B_1
e) conține 40 γ vitamină B_1.

Fig. 49. Repartiția vitaminei B_1 în bobul de orez

A fost izolată sub formă cristalizată din cojile de orez (fig. 49). Procedeul utilizat permitea să se obțină 1 parte vitamină din 3 000 000 părți coji. In 1935 s'a reușit sinteza (din 2 metil-5-brommetil-6-aminopirimidină și 4-metil-5-β-hidroxietiltiazol), ceeace permite o preparare industrială.

Proprietățile chimice și fizice ale vitaminei B_1. Vitamina B_1 este un produs alb cristalizat. Prin oxidare lentă trece într'un produs colorat în galben cu fluorescență intensă spre albastru și care este din punct de vedere chimic un amestec de mai multe substanțe numite *chinocrome*; din acestea, unele au acțiune vitaminică, de exemplu *tiocromul* care are 2 H mai puțin decât tiamina și e utilizat pentru dozarea vitaminei B_1 prin transformarea acesteia în tiocrom și determinarea fluorescenței compusului obținut.



tiocrom

Acțiunea fiziologică a tiaminei. Tiamina (vitamina B_1) este esențială pentru creșterea și metabolismul animalelor, precum și a multor plante și microorganisme. Lipsa de tiamină din alimentație produce o serie de turburări generale caracterizate prin: inapetență, hipotermie, astenie generală. Sunt caracteristice fenomenele polinevritice, o formă de nevrită periferică care interesează atât nervii senzoriali, cât și pe cei

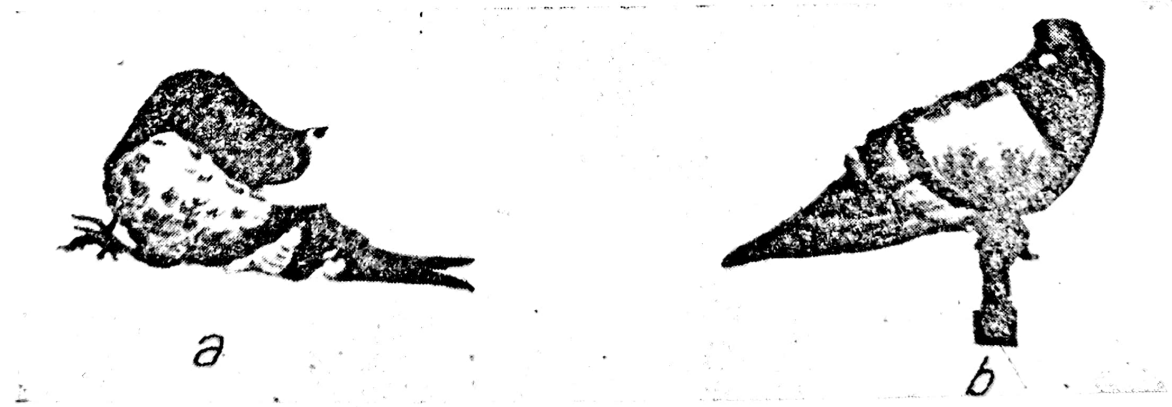


Fig. 50. Porumbel cu avitaminoză B_1 (a). Același porumbel după aport de vitamină B_1 (b).

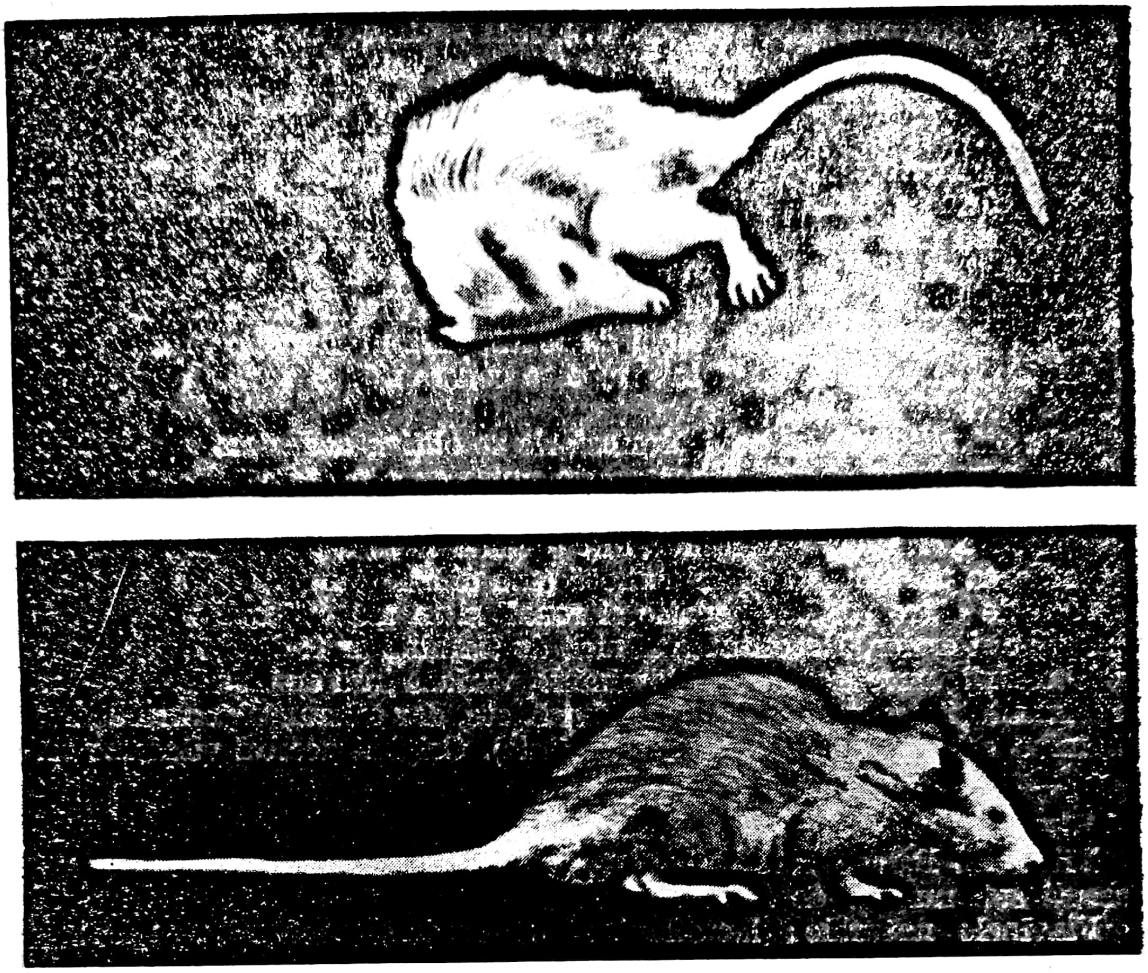


Fig. 51. Efectul carenței în tiamină și ameliorarea adusă după un interval de 24 ore de alimentație adecuată.

motori. Aceste turburări se manifestă fie sub forme spastice, fie sub forme paralitice, primele fiind tipice acestei avitaminoze. Avitaminozele spontane apar la om sub forma afecțiunii acute cunoscută sub numele de beri-beri, în special la popoarele care se hrănesc cu orez decorticat. Această avitaminoză nu este o avitaminoză B_1 pură, predomină însă simptomele ei caracteristice.

Avitaminoza B_1 experimentală, provocată la șobolani și porumbei (beri-beri al păsărilor sau polinevrita aviară) (fig. 50), atacă în special sistemul nervos central; apar fenomene paralitice sau fenomene spastice, și atunci când carența se prelungește, moartea survine în urma turburărilor respiratorii. La animale, simptomele sunt deci pierderea coordonării musculare, mișcări spastice, opistotonus și paralizie.

Administrarea de vitamină B_1 aduce în câteva ore vindecarea, în special când este administrată prin injecții (fig. 51). Debilitatea și scăderea progresivă a greutății reprezintă un simptom precoce al deficienței de vitamină B_1.

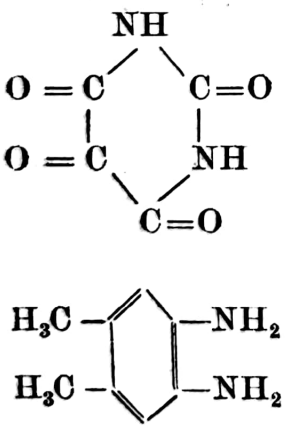
In organismul animal, tiamina joacă un rol important în metabolismul glucidelor, deoarece este componenta unei enzime care intervine în acest metabolism. *Esterul pirofosforic al tiaminei* este *coenzima carboxilazei*, enzimă care catalizează reacţia de degradare a acidului piruvic în acid oxaloacetic. Vom vedea la capitolul asupra metabolismului glucidelor că acidul piruvic este un produs intermediar crucial în acest metabolism. Intr'adevăr, o deficienţă în tiamină la porumbel şi şobolan duce la apariţie de acid piruvic în sânge şi urină şi la creşterea glicogenului hepatic. Oxidarea glucidelor în carenţă de vitamină B_1 se face deci până la stadiul de acid piruvic. Aportul de vitamină B_1 duce la dispariţia acidului piruvic. Se mai confirmă relaţia tiaminei cu metabolismul glucidic prin aceea că necesitatea în această vitamină nu este constantă, ci variază cu bogăţia alimentaţiei în glucide.

Prin esterificarea cu acid pirofosforic se obţine coenzima carboxilazei, sau cocarboxilaza. Cocarboxilaza, prin unire cu o proteină, formează carboxilaza, care am spus că are un rol fundamental în metabolismul glucidelor. Deasemenea, sinteza grăsimilor din glucide necesită prezenţa tiaminei. Fosforilarea tiaminei în cocarboxilază (sau difosfotiamină) este efectuată in vivo de către ţesutul hepatic şi renal, şi în măsură mai mică, în cel muscular şi creier. Necesitatea zilnică de tiamină ar fi de 0,6 mg pentru 1 000 calorii; necesitatea de vitamină B_1 variază însă cu o serie de factori, cu alimentaţia, cu metabolismul de bază, etc, dar toleranţa pentru această vitamină este foarte mare (500 mg zilnic). Origina acestei vitamine este esenţialmente vegetală.

Vitamina B_2 sau Riboflavina

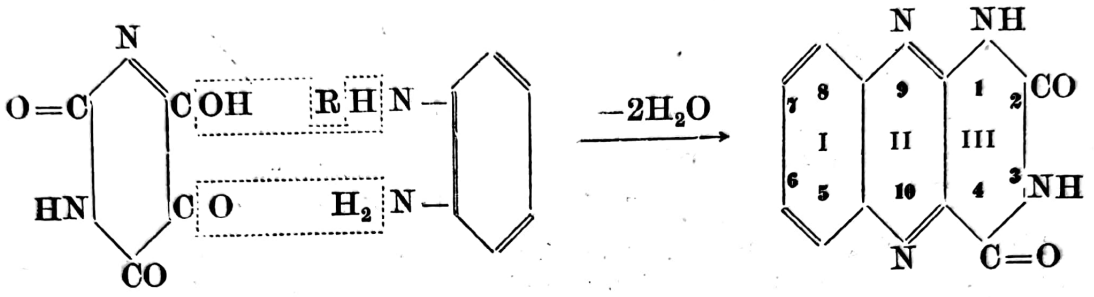
Vitamina B_2 sau riboflavina aparţine clasei de pigmenţi galbeni cunoscuţi sub numele de flavine.

Flavinele naturale: lactoflavine, ovoflavine, hepatoflavine, verdoflavine izolate respectiv din lapte, creier, ficat şi iarbă, sunt compuşi chimic identici cu riboflavina.

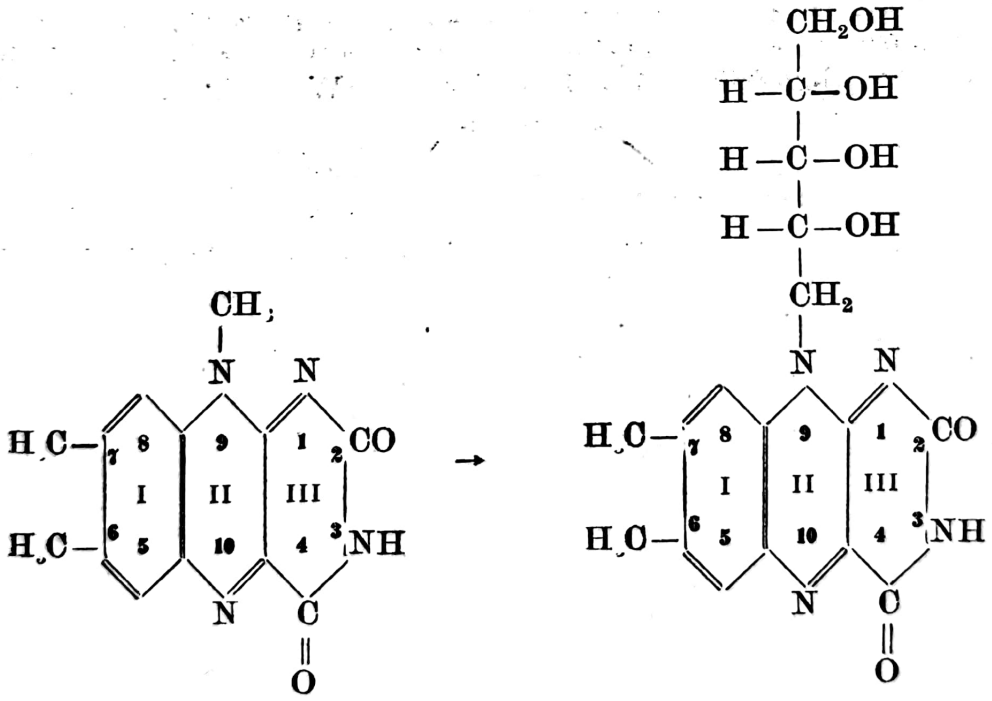


Structura chimică. Are formula brută $C_{17}H_{20}N\ O_6$. Din punct de vedere chimic este un derivat de izoaloxazină şi de D-ribitol, un polialcool cu cinci atomi de carbon, şi anume este un izoaloxazinribitol. Aloxanul (care derivă din acidul uric prin oxidare cu acid azotic sau Cl născând) produce prin condensare cu ortofenilendiamina (substituită cu 2 metil) şi eliminarea a două molecule de apă izoaloxazina, la care prin substituire de grupuri metilice la atomii 6, 7 şi 9 se obţine 6, 7. 9, —metilizoaloxazina; substituind la atomul 9 (la atomul de N) în locul metilului ribitolul, alcoolul corespunzător pentozei riboza, se obţine riboflavina sau vitamina B_2. Riboflavina este astfel formată din trei nuclei condensaţi, şi anume: un nucleu benzenic (I) unit prin intermediul a 2 N (care stabilesc astfel al doilea ciclu) cu un al treilea heterociclu hexagonal conţinând 2 N în poziţia meta (ciclul aloxanului). Prin fixare la N în poziţia (9) a unei catene laterale, care este un alcool al D-ribozei (cuprinzând o funcţie de alcool primar şi trei funcţii alcoolice secundare) (ribitolul), se obţine riboflavina.

Proprietăţile chimice şi fizice. Cristalizează sub formă de ace galben-portocalii; foarte solubilă în soluţii alcaline. In soluţie e galbenă şi are o fluorescenţă verde-galbenă. Este stabilă la încălzire în mediu neutru sau acid, instabilă în mediu alcalin. Are un gust amar. Rezistă în genere acţiunii oxigenului şi oxidanţilor, este sensibilă acţiunii reductorilor (hidrogen-hidrosulfit); prin reducere trece în compusul incolor *leucoriboflavină*. Leucoriboflavina, produsul său de reducere, incolor şi nefluorescent, este însă uşor reoxidat prin agitare în aer, trecând din nou în riboflavină.

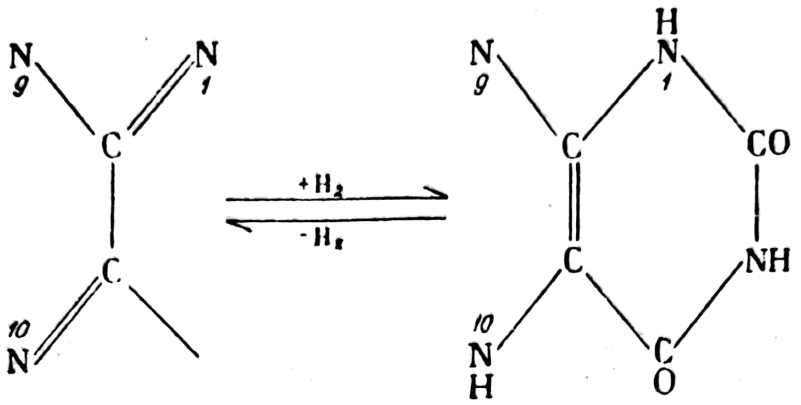


aloxan o-fenilen-diamina substituită aloxazina



Acest proces de oxidoreducere reversibil vom vedea că are un rol important, condiţionând acţiunea fiziologică a riboflavinei în procesele de oxido-reducere celulară. Reacţia care se petrece este fixarea reversibilă a 2H la azotul 1 şi 10 din ciclurile II şi III ale riboflavinei, cu dispariţia celor două duble legături conjugate din aceste cicluri. Modificarea acestor

grupări duce la o modificare a culorii compusului şi constitue astfel *grupul cromofor al riboflavinei*

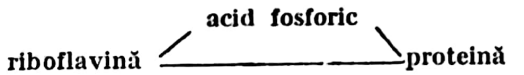


riboflavina — leucoriboflavina

(sistemul cromofor al riboflavinei)

Vitamina B_2 în organism. Riboflavina este foarte răspândită în natură în plante şi ţesuturi animale, sub formă de riboflavină liberă sau sub formă de ester fosforic, constituind riboflavinmononucleotidul, şi sub formă de adenindinucleotidfosfat.

Riboflavina liberă se găseşte în special în retină, lapte şi urină. Riboflavinnucleotidele se găsese în special legate cu o proteină, constituind sub această formă una din importantele enzime care intervin în oxidările celulare, anume „fermentul galben respirator" (Warburg şi Christian).



fermentul galben respirator

Riboflavina este sintetizată de plantele superioare, levuri şi unele bacterii; animalele nu o pot sintetiza. In organism are loc o depozitare masivă a riboflavinei; concentraţii mai mari se găsesc în ficat şi rinichi. La plante, porţiunile tinere sunt mai bogate în vitamine. In seminţele în germinaţie creşte cantitatea de riboflavină.

Rolul fiziologic al riboflavinei. Carenţa în vitamina B_2 influenţează în primul rând ţesuturile ectodermice, producând leziuni ale pielei, ochilor, (fig. 52), nervilor. Riboflavina este indispensabilă tuturor animalelor. Avitaminoza B_2 se manifestă în experienţele pe animalele tinere printr'o oprire a creşterii şi, când carenţa este prelungită, duce la moartea animalului. Vitamina B_2 are rol şi în procesul vederii crepusculare alături de vitamina A şi acolo unde aceasta din urmă nu e eficace. Retina şi în special retina peştilor conţine riboflavină liberă, care sub acţiunea luminii este transformată într'un compus ce participă la stimularea nervului optic. Ea ar avea rolul să transforme undele luminoase scurte în unde mai lungi perceptibile. Compuşi naturali cu activitate vitaminică B_2 au numai riboflavina liberă şi nucleotidele corespunzătoare: *mononuclotidriboflavina şi dinucleotidadeninriboflavina. Aceasta din urmă intră în structura unor enzime de oxidoreducere cu rol fundamental în oxidările celulare. Riboflavina joacă astfel un rol important într'o serie de sisteme enzimatice, fiind o componentă a acestor sisteme. Aceste enzime constau dintr'o combinaţie a riboflavinei cu acidul o-fosforic şi o proteină.*

Rolul fiziologic al riboflavinei aparţine pe de o parte riboflavinei sub formă liberă, pe de altă parte riboflavinei în calitate de componentă a unor sisteme enzimatice importante ce vor fi studiate la capitolul enzimelor (citocrom C reductaza, d-aminoacid-oxidaza, xantinoxidaza).

Se crede că acţiunea vitaminei B_2 asupra creşterii animalelor tinere este legată de riboflavină sub forma sa esterificată, de ester fosforic. Intr'adevăr, la animalele la care se inhibă esterificarea, respectiv fosforilarea, cu acid iodacetic, are loc oprirea creşterii animalului. Acest lucru este înlăturat prin aport de ester fosforic al riboflavinei. Esterificarea cu acid o-fosforic se face la radicalul ribitol.

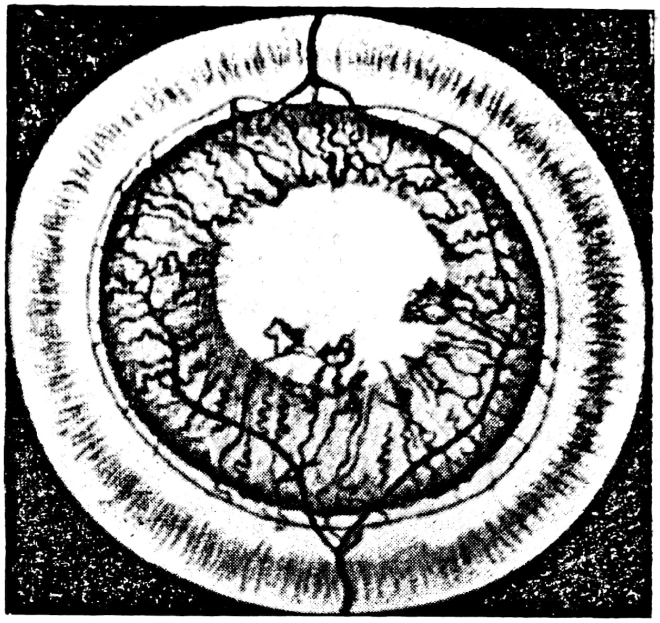


Fig. 52. Vascularizarea corneei la şobolanul în avitaminoză B_2.

Grupările metilice $-CH_3$ substituite la C_6 şi C_7 au un rol important în activitatea vitaminei. Inlăturarea uneia din grupări scade această activitate; înlăturarea ambilor metili duce la un produs toxic. Substituirea în poziţia C_3 cu un alchil suprimă activitatea.

Riboflavina este fosforilată (esterificată) în intestinul animalelor superioare, probabil print'o reacţie enzimatică (fosfataze specifice). Administrarea de inhibitori ai fosforilării împiedică absorbţia vitaminei din tractul intestinal, şi în aceste condiţii vitamina B_2 liberă nu stimulează creşterea.

Ciclul vitaminei B_2 în natură ar fi următorul: vitamina B_2, sintetizată numai de plante (şi microorganisme) e luată din plantele verzi sub formă de compus fosforilat şi unit cu o proteină (ferment galben). Prin fierbere sau sub acţiunea sucului gastric se eliberează vitamina B_2 (liberă) care e absorbită ca atare. In intestin are loc din nou esterificarea cu acid fosforic. Sub acţiunea fosfatazelor, transformarea complectă în enzimă prin unirea acestui ester fosforic cu o proteină se face abia în ficat; rezultă esterul fosforiboflavinproteina sau „fermentul galben", care funcţionează în oxidoreducerile celulare, participând în special în metabolismul glucidelor. E interesant că, în lapte, vitamina B_2 este sub formă liberă şi dată ca atare în hrana copilului mic.

Metodele de determinare a vitaminei B_2 sunt de două tipuri: *chimice* şi *biologice*. Metodele chimice sunt bazate pe determinări *colorimetrice* şi *fluorometrice*.

Metodele microbiologice sunt bazate pe acţiunea de stimulare a creşterii unui bacil, *Lactobacillus casei*; metoda e sensibilă şi specifică.

In *testul biologic* se utilizează ca animal de experienţă şobolanul tânăr. Acesta e supus unui regim de carenţă în vitamina B_2, până ce apar simptomele caracteristice (scăderea greutăţii). Se determină apoi cantitatea de

vitamină B_2 administrată zilnic animalului care face să-i crească greutatea cu 40 g în interval de 30 de zile. Aceasta se socoate drept unitate de vitamina B_2.

Necesitatea zilnică de vitamină B_2 e considerată a fi 2—3 mg.

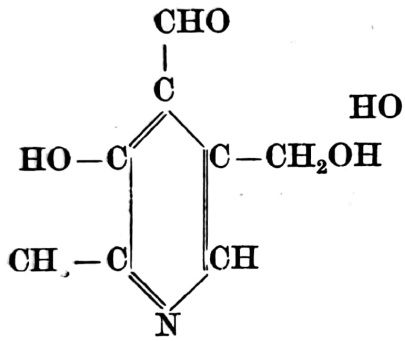
Vitaminele B_3, B_4 și B_5

Sunt necunoscute din punct de vedere chimic. B_3 este un factor de creștere al porumbelului, termolabil, B_4 un factor antiparalitic la păsări și poate la șobolan, B_5 un factor de creștere al șobolanului, termostabil.

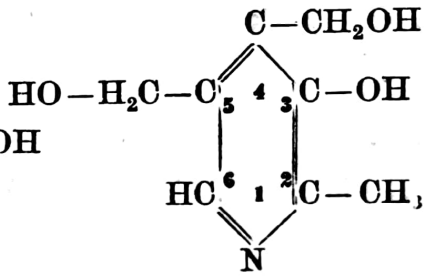
Vitamina B_6

Vitamina B_6 sau piridoxina era cunoscută și sub numele de adermină, de vitamina antipelagroasă a șobolanului și de vitamină antidermatozică.

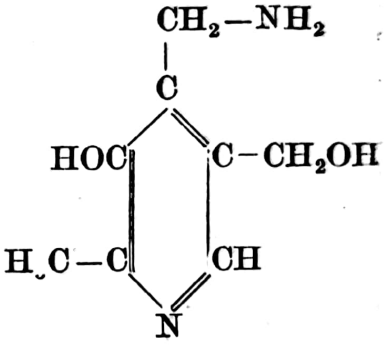
Structură chimică. Are formula brută $C_8H_{11}O_3N$. Este un derivat de piridină și anume: 3-hidroxi-4—5-dihidroximetil-2-metilpiridină



piridoxal



piridoxină



piridoxamină

are deci un metil în poziție α în raport cu N din ciclu; un oxidril fixat la C_3 din nucleu; are la C_4 și C_5 substituite două funcții alcool primar.

S'a constatat că această vitamină apare însă în natură și sub forma de aldehidă și are numele de piridoxal, și sub forma de amină și cu numele de piridoxamină. Piridoxina, piridoxalul și piridoxamina, cele trei forme sub care apare această vitamină în natură, au activitate biologică identică pentru animalele superioare, dar diferită asupra microorganismelor.

Proprietăți fizice și chimice. Este un compus cristalizat, alb, incolor, ușor amar. Cu clorura ferică dă un compus colorat în galben-roșu. Dă o colorație roșie caracteristică prin transformarea sa în iodometilat, prin încălzire cu cloroform și etilat de sodiu, în mediu de iodură. Cele trei forme ale vitaminei B_6 (piridoxina, piridoxalul, piridoxamina) au spectre de absorbție caracteristice. Sunt distruse prin expunere la lumină. Sunt stabile la încălzire până la 100° în mediu acid.

Repartiție. Sursele principale de vitamina B_6 sunt drojdia de bere, ficatul animalelor, carnea de pește, cojile de orez, cerealele, semințele. Se găsește în special legată de proteine.

Acțiune fiziologică. Carența în vitamină B_6 la șobolani produce tumefacție, edem, hemoragii, căderea părului, eroziuni caracteristice prin repartiția lor simetrică de o parte și de alta a botului, labelor, urechilor.

Avitaminoza prelungită duce la oprirea creșterii animalelor tinere și la degenerare nervoasă. Vitamina este esențială deasemenea pentru șobolani, câine și numeroase microorganisme. Necesitatea în vitamina B_6 s'a pus

în legătură cu metabolismul acizilor graşi nesaturaţi, dermatitele constatate în avitaminoza B_6 fiind analoage cu cele ce se produc în cazurile de deficienţă în acizi graşi.

S'a arătat deasemenea rolul vitaminelor B_6 în *metabolismul proteinic,* şi anume în *metabolismul triptofanului.* Se crede că ar interveni în aceste procese chimice ca o componentă a unor sisteme enzimatice care joacă un rol în sinteza aminoacizilor la microorganisme, în decarboxilarea tirozinei, argininei, acidului glutamic şi dihidroxifenilalaninei. Ar fi coenzima transaminazelor.

Există indicaţii că ar avea rol în sinteza hemoglobinei şi formarea globulului roşu.

Rolul piridoxinei la om nu este perfect cunoscut. Ar avea acţiune sedativă. Nevoia zilnică ar fi de 2 mg. A fost utilizată în clinică în acnee şi alte dermatite.

Vitamina B_6 este prezentă în toate ţesuturile animale.

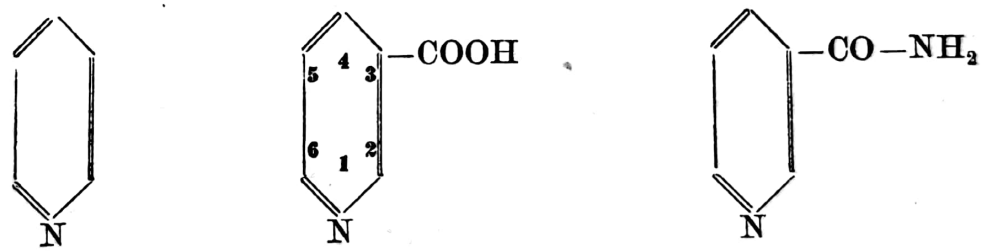
Metodele de determinare sunt în special metode microbiologice.

Niacina

Sau vitamina antipelagroasă sau vitamina PP sau amida acidului nicotinic.

Carenţa de niacină în alimentaţia omului produce o boală caracterizată prin leziuni cutanate — pelagra ; administrarea acestei vitamine înlătură fenomenele de carenţă caracteristice.

Structură chimică. Este un derivat de piridină şi anume piridin-3-acid carboxilic. Se găseşte în natură în special sub forma amidei corespunzătoare, cu care are acţiune fiziologică identică, nicotinamida sau niacinamida.



piridina — niacina (acidul nicotinic) (piridin—3—acid carboxilic) — niacinamida (amida acidului nicotinic)

Acţiune fiziologică. La om, carenţa în niacină sau niacinamidă produce pelagra. Aceasta apare în special în regiunile unde mălaiul este alimentaţia de bază. In carenţa vitaminică a niacinei, leziunile cutanate caracteristice sunt precedate de turburări funcţionale, astenie, indigestie, diaree, turburări mintale (dermatită, diaree, demenţă, cele trei D-uri). Leziunile cutanate sunt eriteme care se desvoltă în general bilateral şi simultan. Expunerea la lumina solară creşte gravitatea leziunilor ; sunt atinse în general dosul palmelor, genunchii, coatele, talpa picioarelor (fig. 53).

Vindecări spectaculoase ale pelagrei au loc prin administrarea de niacinamidă. Doza terapeutică de 50—500 mg zilnic face să dispară fenomenele şi leziunile caracteristice în 3—5 zile. Carenţa în niacină este cel mai adesea asociată cu alte avitaminoze B.

Fig. 53. Modificări cutanate în pelagră

Alimentele mai bogate în niacinamidă sunt: ficatul, rinichiul, inima, carnea de vacă, peştele, laptele, spanacul, tomatele. Necesitatea zilnică = 50 — 100 mg (după alţii 12—20 mg).

Niacina este esenţială fiziologiei animalelor, plantelor şi microorganismelor. Avitaminoza experimentală, analoagă pelagrei umane, a fost reprodusă la câini, unde îmbracă aspectul nosologic cunoscut sub numele de „limbă neagră".

Rolul fiziologic important al niacinei, respectiv al niacinamidei ar fi datorit faptului că niacinamida este un constituent al unor enzime cu rol fundamental în oxidările celulare: coenzimele I şi II (codehidrogenazele I şi II).

Gruparea activă din aceste coenzime este însăşi nicotinamida, care joacă rol de transportor în oxidările celulare (vom vedea acest lucru în dataliu la capitolul enzimelor).

Importanţa niacinei în calitatea ei de componentă a acestor sisteme enzimatice este indicată prin corelaţia care există între aportul acestei vitamine şi concentraţia coenzimelor de niacină în muşchi. Aportul exterior de niacină este în funcţie şi de bogăţia alimentaţiei în proteine şi carbohidraţi. Un compus analog, niacinei, şi anume *piridin-3-acid sulfonic,* s'a dovedit a fi un inhibitor al creşterii microbiene; probabil şi din cauza analogiei de structură, lucrează ca inhibitor competitiv al acestei vitamine în sistemul enzimatic fiziologic indispensabil. Niacinaminele sub forma de coenzime apar în levură, în globulele roşii, în muşchiul cardiac.

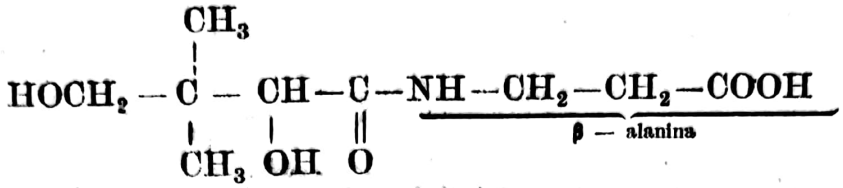
Acidul pantotenic

Carenţa în acidul pantotenic provoacă la puii de găină leziuni cutanate, depigmentare, oprire a creşterii. Vitamina este necesară reproducerii, dar nu producerii de ouă. La şobolani, carenţa duce la leziuni cutanate necrotice, la oprirea creşterii.

Este necesar metabolismului tuturor bacteriilor. Nu se ştie cu precizie rolul său la om, dar este desigur esenţial pentru anumite funcţii. Necesitatea zilnică ar fi de 5—10 mg. Este prezent în toate ţesuturile vii. Sursa cea mai importantă o constitue ficatul şi rinichiul. Poate fi sintetizat de anumite ciuperci, bacterii, levuri.

Scanned with OKEN Scanner

Structură chimică. Este amida alaninei și a acidului α, γ — dihidroxi-β-dimetilbutiric.



acid pantotenic

Se numește acid pantotenic pentru a indica distribuția sa universală, deoarece este răspândit peste tot.

Apare liber și sub formă combinată. Este optic activ. A fost sintetizat sub forma sării sale de calciu. Se determină prin metode microbiologice, în special prin măsurarea stimulării creșterii β-*lactobacillus arabinosus*.

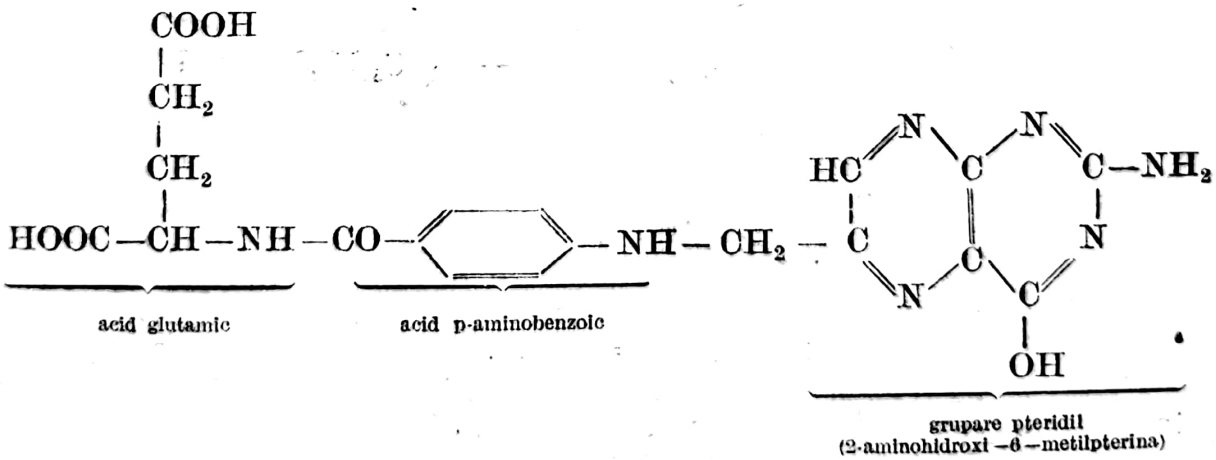
Rolul fiziologic al acidului pantotenic este probabil fundamental, deoarece este răspândit în toate țesuturile animale și vegetale. Acest rol este legat probabil de metabolismul glucidelor și depinde de structura sa chimică, componenta β-*alaninică*.

Nevoia zilnică de acid pantotenic este de aproximativ 3 mg.

Acidul pteroilglutamic sau acidul folic

A fost descris în primele cercetări și sub numele de vitamină B_c, vitamina M, factor U, factor Lactobacillus casei, etc., datorită faptului că o serie de compuși conjugați ai acidului pteroilglutamic sunt foarte răspândiți în natură și au acțiuni vitaminice de intensități variabile (fig. 54).

Structura chimică a acidului pteroilglutamic și sinteza sa au fost lămurite în anul 1946. Molecula constă dintr'o grupare pteroil legată prin legătură metilenică, prin intermediul acidului p-aminobenzoic, de acidul glutamic. Are formula:



acidul pteroilglutamic

Proprietăți fiziologice. Este un factor de creștere indispensabil pentru unele bacterii: *Streptococcus lactis, Lactobacillus casei*.

Acidul pteroilglutamic ameliorează sau chiar vindecă anumite boli de sânge, ca de exemplu cele caracterizate prin anemie macrocitară.

Fig. 54. Cristale de acid pteroilglutamic sintetic (aspectul în lumină polarizată).

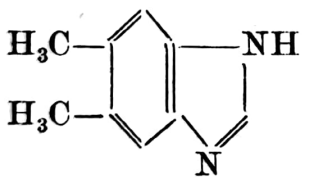
In anemia megaloblastică biermeriană, administrarea orală sau parenterală în doze de 1 — 10 mg zilnic, are anumite efecte bune. Produce o modificare a formulei măduvei oaselor.

Vitamina B_{12}

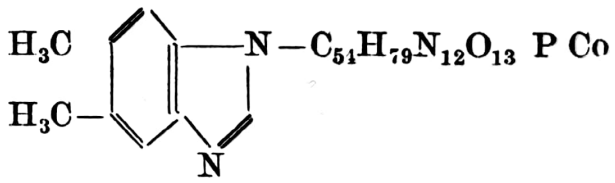
Vitamina B_{12} a fost izolată recent (1948) din ficat, sub forma unor cristale de culoare roşie, coloraţia roşie dovedindu-se a fi datorită prezenţei cobaltului în moleculă. Vitamina B_{12} are acţiune antipernicioasă intensă, 3 mg ajung pentru a produce un răspuns hematologic la pacienţii cu anemie megaloblastică biermeriană; deaceea, vitamina B_{12} se mai numeşte şi factor antipernicios al ficatului. Este aproape cel mai puternic agent hematopoetic cunoscut până acum.

Structura chimică a vitaminei B_{12} nu se cunoaşte încă perfect. Are formula brută $C_{63}H_{88}N_{1}O_{13}P\,Co$.

Este singura vitamină cunoscută care conţine un metal în moleculă, şi anume un atom de Cobalt. Prin hidroliză, eliberează 5—6 dimetilbenzimidazolul, de unde rezultă că vitamina B_{12} are structura următoare:



5-6-dimetilbenzimidazol



vitamina B_{12}

Pe baza conţinutului în Co (are un singur atom de Co în moleculă) i se deduce greutatea moleculară = 1 640.

Vitamina B_{12} este optic activă. Prin hidrogenare reversibilă trece într'un compus cu activitate vitaminică cu 30% mai slabă, notat B_{12} a.

Din extractul hepatic s'a izolat pe cale cromatografică, în afară de fracţiunea B_{12}, o altă fracţiune având maximele benzilor de absorbţie deplasate către zona micilor lungimi de undă. Fracţiunea aceasta este notată $B_{12}b$.

Acţiune fiziologică. Vitamina B_{12} este un factor de creştere pentru *Lactobacillus lactis* Dorner, proprietate utilizată pentru dozajul micro-

biologic al acestei vitamine. Există o directă proporţionalitate între activitatea antipernicioasă a vitaminei B_{12} şi acţiunea ei asupra creşterii acestui germen. Dozajul chimic al acestei vitamine se face prin determinarea cobaltului.

Se presupune că rolul fiziologic al vitaminei B_{12}, ca şi al celor mai multe vitamine, s'ar datora faptului că sunt componente ale unor enzime importante. Astfel, se crede că vitamina B_{12} ar constitui coenzima sistemului enzimatic care sintetizează nucleozidele din purine (respectiv timidina din timină).

Se crede deasemenea că ar exista o corelaţie între vitamina B_{12} şi acidul folic, deşi nu au în totul acţiune sinergică.

In sucul gastric al bolnavilor de anemie megaloblastică biermeriană există un sistem care împiedică acţiunea vitaminei B_{12}, fie prin distrugerea ei, fie împiedicându-i asimilarea.

Biotina

Este identică cu vitamina H, o vitamină esenţială pentru guzgan, maimuţă, iepure, câine, om şi o serie de organisme inferioare. Carenţa în această vitamină e greu de reprodus experimental din cauza posibilităţii de a fi sintetizată de către flora intestinală la animalele superioare. Simptome de carenţă pot totuşi fi provocate prin hrănirea cu substanţe cu care biotina formează compuşi neabsorbabili sau prin hrănirea cu sulfamide, care se ştie că, interferează sinteza acestei vitamine de către bacteriile intestinale.

Albuşul de ou crud administrat guzganilor provoacă la aceştia o dermatoză seboreică, pierderea părului, scăderea greutăţii şi moartea.

Albuşul crud conţine o proteină distinctă, numită „*avidina*", capabilă să se unească stoichiometric cu biotina, împiedicând astfel absorbţia ei în tractul digestiv şi, în genere, utilizarea ei de către celule.

La om, simptomele de deficienţă în biotină apar în urma alimentării cu cantităţi mai mari de albuş de ou.

Avidina se prezintă deci ca o antivitamină. Hrănirea cu biotină produce la guzgan o creştere a sintezei grăsimilor şi colesterolului în ficat.

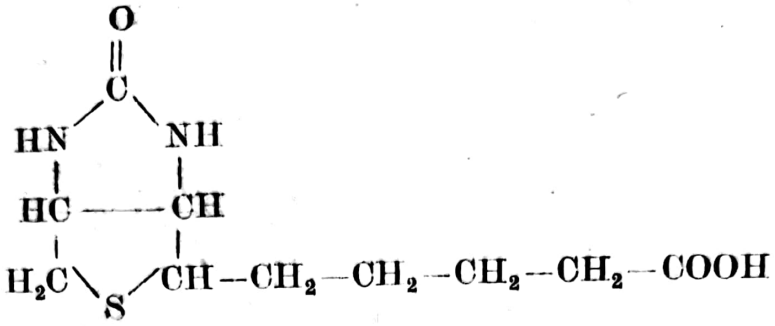
Se mai numeşte şi vitamină antiseboreică a şobolanului, deoarece la şobolanii în carenţă de biotină se produce o dermatoză seboreică.

Ţesuturile embrionare şi tumorale, ambele caracterizate printr'o creştere rapidă, conţin cantităţi mari de biotină. Administrarea parenterală a biotinei e de trei-cinci ori mai eficace decât cea orală. La om avitaminoza aceasta este deasemenea caracterizată printr'o creştere a secreţiei sebacee, o degenerescenţă grasă a păturilor superficiale ale epidermului. Se crede astfel că intervine în metabolismul grăsimilor, în special la nivelul pielei şi ficatului, stimulând sinteza lipidelor. Poate fi depozitată în ficat, rinichi ; se găseşte în gălbenuşul de ou, pancreas, drojdia de bere, fie liberă, fie combinată cu o proteină.

Structura chimică a biotinei este cunoscută, vitamina a fost sintetizată (1944). Are în moleculă ciclul tiofen, un nucleu cu structură pirimidinică (2 N în ciclu) şi o grupare carboxilică ; este hexahidro-2-oxo-1-tieno-3-4-imidazol-4-acid valeric.

Scanned with OKEN Scanner

Are deci formula brută : $C_{10}H_{16}O_3N_2S$.



biotina
(hexahidro—2—oxo—1 -tieno—3—4 -imidazol—4—acid valeric)

Este un compus cristalizat, solubil în apă, rezistă la încălzire (la autoclav cu HCl 4N—6 N HCl la 120°) procedeu utilizat pentru liberarea vitaminei din mediile naturale şi testarea microbiologică. Este inactivată de agenţii oxidanţi.

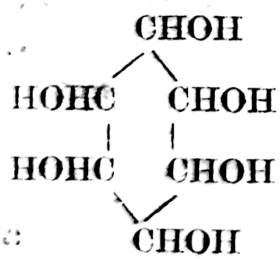
Determinarea biotinei se face prin testuri microbiologice, ca de exemplu stimularea creşterii la *Saccharomyces cerevisiae, Lactobacillus arabinosus* sau *Lactobacillus casei,* pentru care este un factor de creştere. La om se produce o avitaminoză biotinică experimentală prin supraalimentarea cu albuş de ou uscat. Simptomele sunt înlăturate prin aport de vitamină.

Acţiunea ei fiziologică ar fi datorită rolului de coenzimă în carboxilarea acidului piruvic. Pentru om, nevoia zilnică de biotină ar fi de 10 γ.

Inozitolul

Inozitolul sau inozita sau mezoinozitolul era cunoscut înainte şi sub numele de Bios I. Lipsa acestei vitamine din alimentaţia unor animale (şoareci şi şobolani tineri) împiedică creşterea şi produce degenerscenţa grăsoasă a ficatului.

Din cauza structurii lui chimice, similară cu carbohidraţii şi hidrocarburile aromatice, este socotit ca un compus de trecere între aceste două clase. Inozitolul este hexahidroxiciclohexan, un polialcool derivat din ciclohexan. Structura sa brută este : $C_6H_1O_6$.



inozitol
(ciclohexanhexol)

Poate exista sub şapte forme izomere diferite. Izomerul biologic activ este optic inactiv (forma mezo).

Este foarte răspândit în natură — la animale (plămâni, ficat, muşchi), în plante (citrice). In muşchi se găseşte liber (de unde şi numele de zahăr din muşchi). Se crede că ar fi o componentă structurală a moleculei de amilază pancreatică şi că ar avea un rol în metabolismul sau transportul lipidelor.

In vegetale se găseşte sub forma compusului esterificat cu acidul fosforic, cunoscut sub numele de fitină. Inozitolul este un compus cristalizat, cu gust dulce ; se determină prin metode microbiologice.

Acidul paraaminobenzoic

Cunoscut sub numele de PABA, este o componentă indispensabilă pentru multe microorganisme. Am văzut că este una din componentele moleculei acidului pteroilglutamic.

Scanned with OKEN Scanner

Este probabil că joacă un rol esențial, participând la anumite reacții enzimatice. Nu se cunosc la om efectele specifice ale deficienței în acid paraaminobenzoic. Impiedică acțiunea bacteriostatică a sulfonamidelor, probabil datorită unei similitudini de structură chimică. Antagonismul urmează legea acțiunii masselor, ceeace arată că inhibarea este competitivă.

Acțiunea sa antisulfonamidă are loc in vivo și in vitro.

PABA este prezent în cele mai multe țesuturi.

Apare în natură liber combinat.

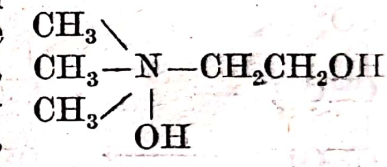
Are formula:

Este necesar creșterii unor microorganisme.

In combinație cu inozitolul previne decolorarea părului la șobolanii negri.

Colina

Este clasificată de unii autori în complexul vitaminelor B. E numită și factor lipotropic și factor de transmetilare. Este esențială pentru creșterea normală a șobolanului, puiului de găină, câinelui și pentru lactația șobolanului. Are funcții fiziologice multiple. Intră în structura fosfolipidelor și acetilcolinei. Intervine în procesul de transmetilare. In absența colinei, grăsimile, neutre și, în anumită măsură, colesterolul, se acumulează în ficat. Este lipotropică, prezența ei împiedică acumularea grăsimilor în ficat. Colina servește ca agent de metilare în procesul fiziologic de transformare a acidului guanidinacetic în creatinină. Metionina și betaina pot să o înlocuiască în această reacție. Transferarea grupării metilice a metioninei-acetilaminei duce la formarea de colină datorită posibilității lor de a forma colină. Colina intervine în transmiterea impulsului nervos sub forma esterului său acetic *acetilcolina*, un agent puternic de scădere a tensiunii arteriale. Organismul menține un echilibru sensibil între acetilcolină și colină (prima cu acțiune depresivă asupra presiunii sanguine, a doua fără acțiune) cu ajutorul unui sistem enzimatic specific, *colinesteraza* și *colinacetilaza*, sistem care acetilează sau desacetilează colina, respectiv acetilcolina.



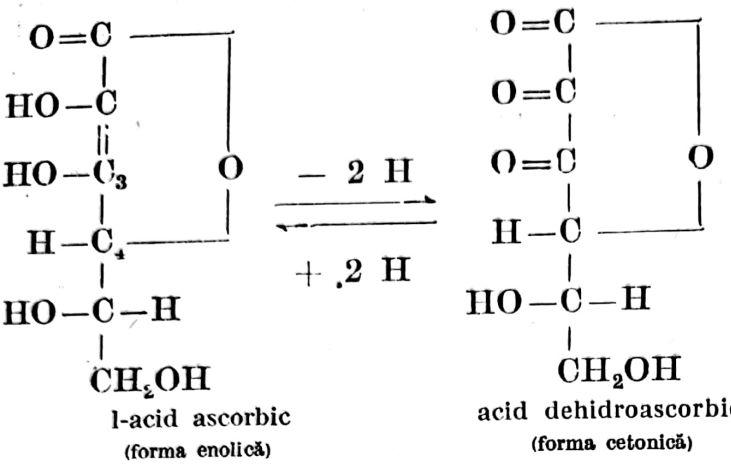
Colina este prezentă în organism în special sub forma de fosfatide (lecitină, sfingomielină). Poate fi sintetizată in vivo din metionină și etanolamină. Concentrația în colină a țesuturilor animale este proporțională cu conținutul în fosfolipide (ficatul, rinichiul, creierul, inima, țesutul nervos sunt bogate); deasemenea se găsește în unele vegetale, etc.

Colina poate fi determinată prin metode microbiologice cu ajutorul ciupercii *Neurospora crassa*.

Acidul ascorbic sau vitamina C sau vitamina antiscorbutică

Carența în vitamina C produce boala cunoscută sub numele de scorbut. A fost izolată (1928, Szent-Györgyi) sub forma cristalizată și apoi sintetizată.

Constituție chimică. Are formula brută: $C_6H_8O_6$. Formula ei este:



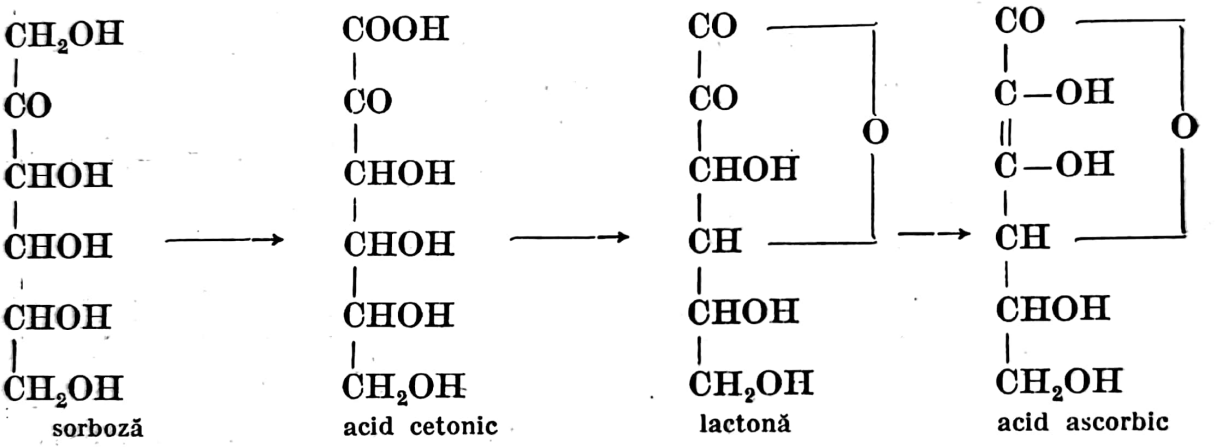
l-acid ascorbic (forma enolică)

acid dehidroascorbic (forma cetonică)

Conține: doi oxidrili enolici fixați la carbonii C_2 și C_3.

Poate funcționa sub formă enolică sau cetonică.

Acidul ascorbic e înrudit cu zaharurile fiind un produs de oxidare al sorbozei. Industrial se prepară din ozazona sorbozei:



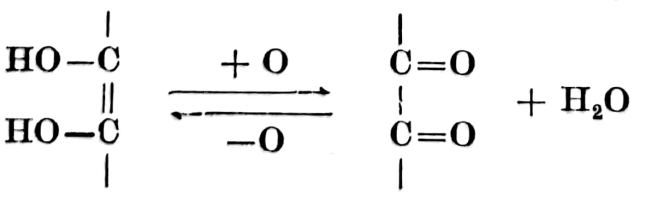
sorboză — acid cetonic — lactonă — acid ascorbic

Există sub forma *l* și *d*, care diferă între ele prin configurația la C_4. Numai forma *l* este fiziologic activă. Are proprietăți acide puternice, nu datorită grupării carboxilice care este fixată sub formă lactonică, ci ionizării grupării enolice dela C_3 (pH 3 în apă).

Cristalele de acid ascorbic sunt foarte stabile. In soluție sunt însă foarte ușor oxidate. Prin oxidare blândă se transformă în acid *dehidroascorbic* (vezi formulele), sub care formă își păstrează activitatea vitaminică. Prin oxidare mai intensă se inactivează; oxidarea de către oxigenul molecular e catalizată de ionii de cupru și argint.

Prin uscarea alimentelor și conservarea lor, activitatea vitamnei este mult distrusă din cauza oxidării. Lumina favorizează distrugerea.

Acidul ascorbic este un reductor puternic, proprietate care e folosită pentru determinarea sa cantitativă (reduce NO_3Ag, albastrul de metilen, 2,6-diclorofenolindofenol). Acidul ascorbic poate exista sub două forme, oxidată și redusă, constituind astfel un sistem oxidoreductor reversibil, rolul biologic al acestei vitamine fiind datorit tocmai acestei proprietăți. Gruparea funcțională importantă din



punct de vedere fiziologic este gruparea dienolică (forma redusă), care trece reversibil în gruparea cetonică (forma oxidată). Ambele sunt fiziologic active. In organism se găseşte în special forma oxidată (dehidroacidascorbic). Arderea acidului ascorbic la acid dehidroascorbic s'ar face în ficat sub acţiunea unei enzime care necesită prezenţa Cu^{++}.

Determinarea vitaminei C se face prin metode chimice şi biologice.

Metodele chimice sunt bazate pe proprietăţile sale reductoare. Se utilizează 2,6-diclorfenolindofenolul, care trece din forma sa colorată în forma leuco, incoloră, sub acţiunea vitaminei.

Metodele biologice folosesc cobaiul ca animal de experienţă şi sunt bazate pe determinarea dozei minime necesară pentru a împiedica sau vindeca simptomele scorbutice (de exemplu, scăderea în greutate a cobaiului supus unei carenţe în vitamina C).

Fig. 55. Modificări ale pielei şi umflături ale pulpei piciorului datorite hemoragiilor în profunzime provocate de avitaminoza C

Răspândirea acidului ascorbic în natură. Sursa cea mai importantă de acid ascorbic sunt fructele proaspete şi vegetalele, în special citricele, fructele crude; ardeiul (paprica) este deasemenea extrem de bogat în vitamina C.

Acţiunea fiziologică a acidului ascorbic. Carenţa în acid ascorbic produce la om scorbutul, cunoscut de foarte multă vreme. Simptomele cele mai caracteristice ale acestei boli sunt: inflamarea şi sângerarea gingiilor, ulceraţii, desosarea şi căderea dinţilor, tendinţă marcată spre hemoragii în general şi în special hematoame subcutanate şi musculare (fig. 55). La copiii mici, simptomele scorbutului sunt hematoame sub periostul oaselor lungi şi a oaselor craniului (boala Möller-Barlow). Boala provine la aceştia dintr'o alimentaţie exclusiv cu lapte de vacă fiert.

Acţiunea vitaminică a acidului ascorbic este legată în special de menţinerea substanţei intercelulare, incluzând colagenul din structura ţesutului fibros, matricea oaselor, cartilajul, dentina, endoteliul vascular. Hemoragiile sunt un simptom predominant în avitaminoză şi, când au loc hemoragii interne, poate surveni moartea.

Studii histologice au arătat importanţa acidului ascorbic asupra desvoltării dinţilor; în avitaminoza C au loc modificări patologice ale dinţilor interesând în special pulpa vasculară, ţesuturile gingivale şi periodontul, cu desvoltarea normală a dentinei şi cimentului. Leziunile dentare sunt caracterizate printr'o degenerescenţă a odontoblaştilor. Un

Scanned with OKEN Scanner

organism scorbutic este mult mai sensibil la infecții. Acidul ascorbic are rol și în osificare.

Experimental s'a putut reproduce avitaminoza C la cobai și maimuțe, dar nu și la șobolani, lucru care se explică prin capacitatea acestor animale de a sintetiza vitamina.

Toate speciile animale, afară de om, maimuță, cobai, pot sintetiza acidul ascorbic.

Este vorba deci de un caz special în care o vitamină poate fi sintetizată de unele organisme animale.

Prin aceasta se face trecerea dela vitamine la hormoni. Sinteza ei s'ar face în ficat.

Vitamina C se găsește în toate celulele; cea mai bogată este zona peridentară, ceeace explică dece simptomele inițiale ale acestei avitaminoze apar în această regiune.

Se constată o depozitare a acidului ascorbic în capsulele suprarenale, precum și în lobul anterior al hipofizei.

Se găsește în mai mare cantitate în organele hormonale și se crede că ar avea rol important în funcția acestora.

In sânge ar exista în valoare medie de 0,5 mg%, iar prin urină se elimină zilnic 30—50 mg.

Animalele care pot sintetiza acidul ascorbic îl depozitează în ficat.

In organismele care nu îl pot sintetiza nu are loc o depozitare masivă, ca probă repeziciunea cu care apar simptomele acestei avitaminoze în carența de vitamina C. Există însă un raport între depozitare și aport de vitamină.

Necesitatea în vitamina C se determină prin așa numitul test de „saturare". Vitamina C fiind o substanță cu prag renal de eliminare, ea nu va fi eliminată în urină decât atunci când nivelul ei în sânge depășește anumite valori. La rândul său, acest nivel depinde de gradul de saturare a țesutului în vitamină. Se determină astfel acidul ascorbic în urină după administrarea unei cantități cunoscute de vitamină.

Rolul biologic al acidului ascorbic ar fi acela de sistem oxidoreductor reversibil, intervenind prin acest mecanism în metabolismul glucidelor (lucrările lui A. Palladin). Are efect hipoglicemiant vagotonic, crește diureza, accelerează coagulabilitatea sanguină; are acțiune de desensibilizare.

Intervine în metabolismul azotat (lucrările lui A. Palladin asupra metabolismului creatinei). Are rol de activator al unor enzime și este inhibitor pentru altele (ureaza). Are acțiune antagonistă cu vitamina A. Prin aport de vitamină C se poate preveni hipervitaminoza A.

Necesitatea zilnică în acid ascorbic este de 1 mg pe kg. Supradozarea nu provoacă fenomene toxice.

Vitamina P

Vitamina P sau *vitamina permeabilității* a fost izolată din lămâie și este cunoscută sub numele de „citrină"; înlătură, după cum a arătat Szent-Györgyi, anumite diateze hemoragice, anumite forme de purpură la om pe care vitamina C singură nu le poate înlătura. Scorbutul ar fi de fapt o avitaminoză C + P. Este mai eficace decât acidul ascorbic singur în tratarea anumitor cazuri de permeabilitate crescută a capila-

relor. Ar lucra astfel asupra permeabilităţii celulare, scăzând-o şi favorizând acţiunea acidului ascorbic.

Din punct de vedere chimic, „citrina" este un amestec de heterozide, de *flavonglicozide.* De exemplu, citrina din lămâie constă dintr'un amestec de *hesperidină* cu *eriodictină.*

Partea II

HORMONII

Hormonii sunt produse de secreţie ale glandelor endocrine (glande cu secreţie internă) şi sunt transmişi pe cale umorală (sanguină) organelor a căror funcţie o influenţează.

Hormonii au rolul fundamental de a regla şi coordona funcţiile diverselor organe.

Studiile asupra hormonilor au fost făcute, ca şi pentru vitamine, prin experienţe pe animale, şi anume:

1. prin studiul fenomenelor aşa zise de „insuficienţă" hormonală care apar în urma extirpării organelor hormonoformatoare, şi

2. prin studiul direct al acţiunii extractelor asupra fenomenelor de insuficienţă hormonală.

Studiul hormonilor a fost mult uşurat de faptul că după circulaţia lor în organism sunt eliminaţi în diverse produse de excreţie (lichide digestive, salivă, urină), de unde au putut fi izolaţi şi studiaţi din punct de vedere fiziologic şi chimic. Urina constitue vehiculul de eliminare din care se pot extrage în modul cel mai comod hormonii, ceeace a permis izolarea şi concentrarea lor şi diagnosticul şi tratamentul unor turburări funcţionale sau al unor procese fiziologice, de exemplu diagnosticul sarcinii, al turburărilor de secreţie a glandelor sexuale, etc.

Din punctul de vedere al structurii lor chimice, hormonii se pot clasifica în două grupe mari:

I. *hormonii derivaţi din steroli* (hormonii steroizi), şi

II. *hormonii derivaţi din aminoacizi,* având o structură chimică ce poate varia dela o simplă bază azotată până la molecula complexă a unei proteine.

I. Hormonii care fac parte din grupa sterolilor, steroidhormonii sau hormonii steroizi, sunt:

1. *hormonii sexuali* (masculini sau androgeni şi feminini sau estrogeni);

2. *hormonii corticosuprarenali,*

3. *organizatorul* (în Embriologie).

II. Hormonii derivaţi din aminoacizi sunt:

1. *insulina,*

2. *adrenalina,*

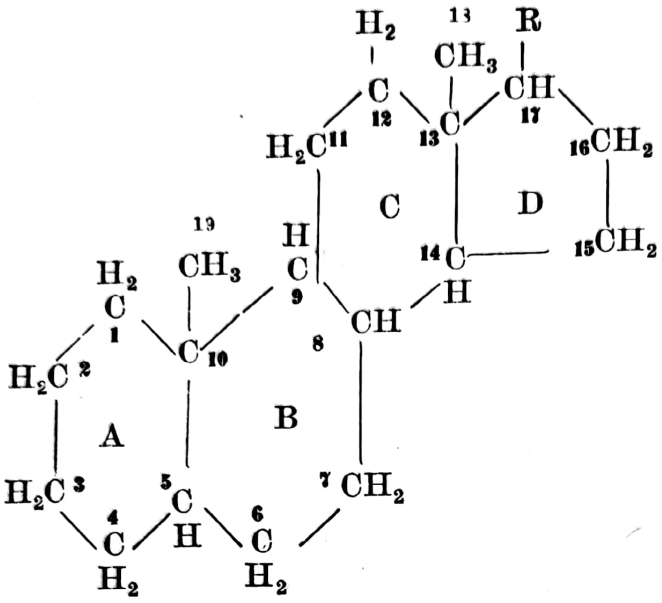
3. *tiroxina,*

4. *hormonii hipofizari,*

5. *fitohormonii sau hormonii vegetali.*

Scanned with OKEN Scanner

HORMONII STEROIZI



Hormonii steroizi au ca schelet al moleculei un inel carbonic format din ciclul fenantrenic şi un ciclu pentagonal : acest inel carbonic stă la baza steroizilor, şi anume, a acizilor biliari, a agliconilor cardiaci (glicozidele, strofantina, digitalina). Aceste steroide se deosebesc între ele prin natura substituenţilor R la C_{17}. Hormonii steroizi au la C_{17} o grupare cetonică sau alcool ca în hormonii sexuali masculini sau feminini, sau o catenă cu doi carboni ca în progesteron şi hormonii corticosuprarenali. Toţi hormonii steroizi au substituită la C_3 o grupare oxidrilică sau cetonică.

I. Hormonii sexuali

Grupa hormonilor sexuali se împarte în : hormoni masculini sau androgeni şi feminini sau estrogeni.

Hormonii masculini

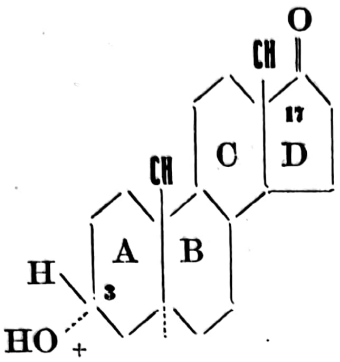
Secreţia hormonilor masculini pare să fie controlată de hormonul gonadotrop al hipofizei. Se cunosc : *androsteronul* cu izomerii săi cis şi trans, *dehidroandrosteronul* (trans) şi *testosteronul*. Toţi derivă din nucleul comun androstanul. **Androsteronul** $C_{19}H_3O_2$ — 3 hidroxi — 17-cetoandrostan este secretat de testiculi şi devărsat în sânge; se elimină prin urină sub forma unor compuşi conjugaţi solubili în apă. Structura sa chimică a fost stabilită pe baza proprietăţii sale de a precipita cu digitonina. Această reacţie caracteristică pentru colesterol a indicat analogia de structură între aceste două substanţe. Are, ca şi colesterolul, patru cicluri A, B, C şi D, însă la C_{17} în locul catenei laterale, are o grupare cetonică. Are la C_3, ca şi colesterolul, o grupare OH care e în poziţia cis în β-androsteron şi în poziţia „trans" în epiandrosteron.

Acestei deosebiri structurale îi corespund deosebiri în activitatea fiziologică şi anume cis-androsteronul are o activitate fiziologică de 1/7 ori mai mică decât trans- sau epi-androsteronul.

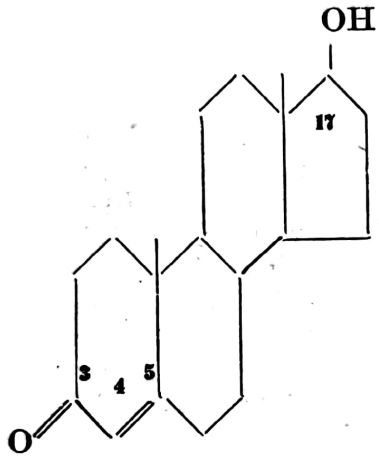
Dehidroandrosteronul $C_{19}H_{28}O_2$-3— trans-hidroxi-17-ceto Δ^4-androsten se deosebeşte de androsteron prin prezenţa unei legături duble în ciclul B între C_3 şi C_6 ; acesta este izomerul *trans* ; se mai numeşte şi transdehidroandrosteron şi are o activitate hormonală de trei ori mai mică decât aceea a transandrosteronului.

Testosteronul, $C_{19}H_{28}O_2$ 3-ceto-17-hidroxi-Δ^4-androsten, izolat din testiculii taurului, are următoarele caracteristici chimice : are la C_3 o funcţie cetonică în locul funcţiei hidroxilice (OH), iar la C_{17} o funcţie

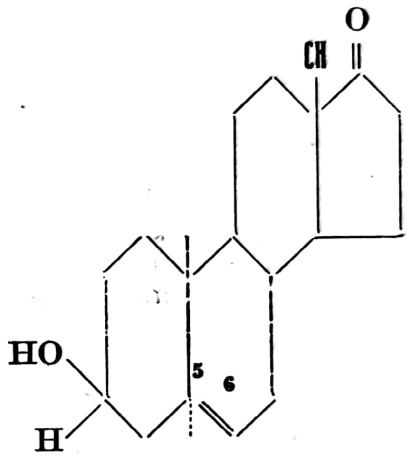
Hormonii masculini



androsteronul ($C_{19}H_{30}O_2$)
(androstan—3 (α)—ol—17—onă)



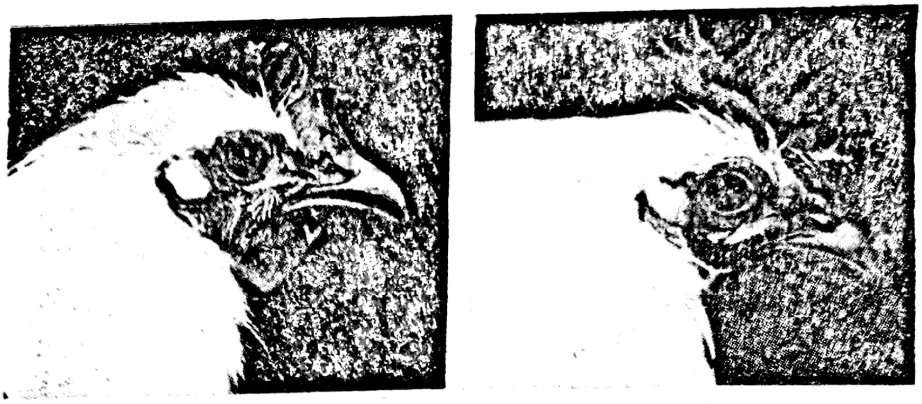
testosteronul ($C_{19}H_{28}O_2$)
(Δ^4—androsten—3—onă—17—ol)



transdehidroandrosteronul
(Δ^5—androsten—3—β—ol—17—onă)

hidroxilică (OH) în locul funcției cetonice. Are o dublă legătură între C_4 și C_5. Legătura dublă din ciclu este astfel conjugată cu funcția cetonică dela C_3. Există „cis" și „trans" testosteron, după poziția hidroxilului dela C_{17} (în raport cu gruparea CH_3 dela C_{13}). *Forma trans este mai activă.* Activitatea testosteronului crește prin esterificarea hidroxilului dela carbonul C_{17} cu radical acetic sau propionic, etc. Prin oxidarea grupării OH dela C_{17} în grupare cetonică are loc o reducere a activității fiziologice; așa dar, compușii cu OH la C_{17} sunt mai activi decât compușii cetonici corespunzători. Testosteronul este hormonul sexual masculin cel mai important. In cursul metabolismului e transformat în androsteron cis și trans. Testele biologice ale hormonilor masculini mai frecvent utilizate sunt: testul crestei de clapon și testul veziculelor seminale la șoarecele sau șobolanul castrat. In primul test se determină ca unitate cantitatea de hormon care face să crească o creastă de clapon cu 10 mm în 10 zile (fig. 56, 57, 58). In al doilea test se determină ca unitate cantitatea care produce o creștere a veziculelor seminale la șoarecele sau șobolanul castrat (fig. 59).

Unitatea internațională standard a hormonului masculin este de 0,1 mg androsteron pur. Prin compararea diverșilor hormoni masculini în testul crestei de clapon, s'a constatat că testosteronul e de 6 ori mai activ decât androsteronul și trans-androsteronul de 1/7 ori mai activ decât androsteronul. Dehidroandrosteronul se găsește în urină. Testosteronul și alte substanțe cu acțiune androgenică au fost preparate din colesterol.



a *b*

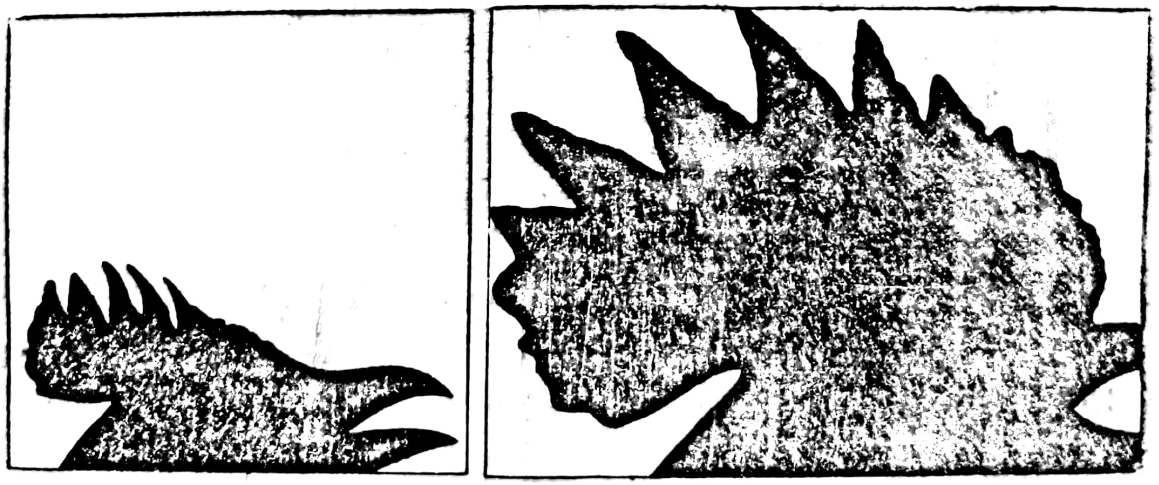
Fig. 56. Desvoltarea crestei la cocoşul castrat:
(*a* înainte de tratament
b) după tratament cu hormoni sexuali

Hormonii feminini

Se împart în două grupe: 1) *hormonii foliculari*, care fac parte din grupa estronei şi 2) *hormonul gestativ luteinic* din corpul galben: *progesterona*. Din punct de vedere fiziologic, hormonii foliculari reprezintă principiul care declanşează faza de proliferare în ciclul menstrual. Din punct de vedere chimic, hormonii feminini foliculari derivă din hidrocarbura de bază estranul (v. formula), care se deosebeşte de hidrocarbura de bază a hormonului masculin, androstanul, numai prin lipsa grupării — CH_3 dela carbonul 10. Caracteristica hormonilor care derivă din această hidrocarbură este prezenţa în ciclul A a trei duble legături conjugate, astfel că acest ciclu este complect nesaturat (v. formula).

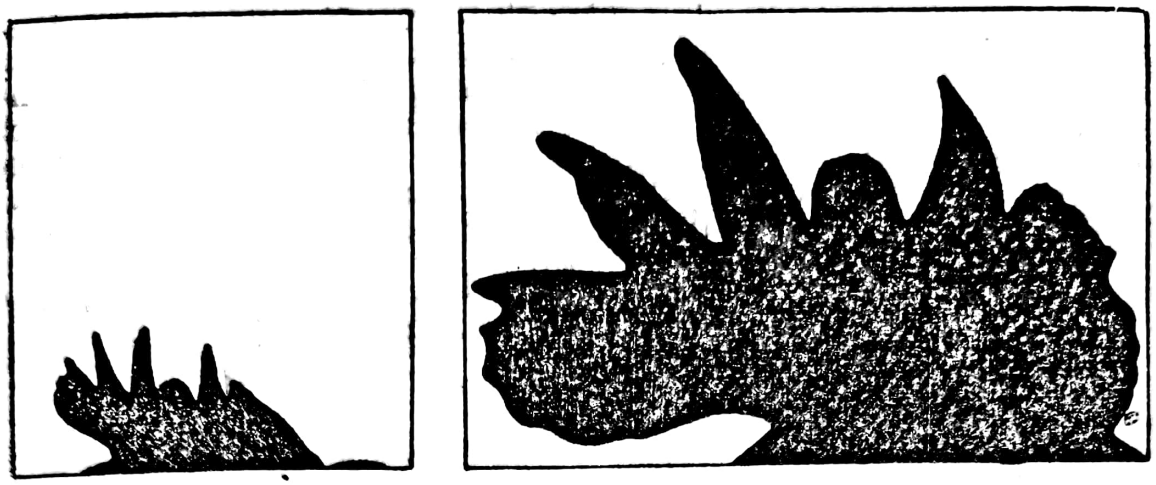
Din grupa estronei fac parte *estrona sau foliculina, estriolul, estradiolul, ecvilenina, ecvilina*, care diferă între ele prin prezenţa la C_{17} şi C_3 fie a grupărilor OH, fie a grupărilor cetonice.

Foliculina sau **estrona** a fost extrasă din urina femeilor gravide; are formula brută $C_{18}H_{22}O$. Are trei legături duble conjugate în ciclul A. Nu mai are la C_{10} radicalul — CH_3, ceeace o diferenţiază de androsteron. Are la C_{17} o grupare cetonică, la C_3 o grupare oxidrilică (ceeace o deosebeşte de testosteron, la care aceste grupări sunt situate invers şi care, în acelaş timp are la ciclul A numai o legătură dublă).



a) înainte de administrarea de testosteron *b*) după administrare de testosteron

Fig. 57. Umbra crestei unui capon



a) înaintea aportului de testosteron *b*) după aportul de testosteron

Fig. 58. Umbra crestei unui pui de găină

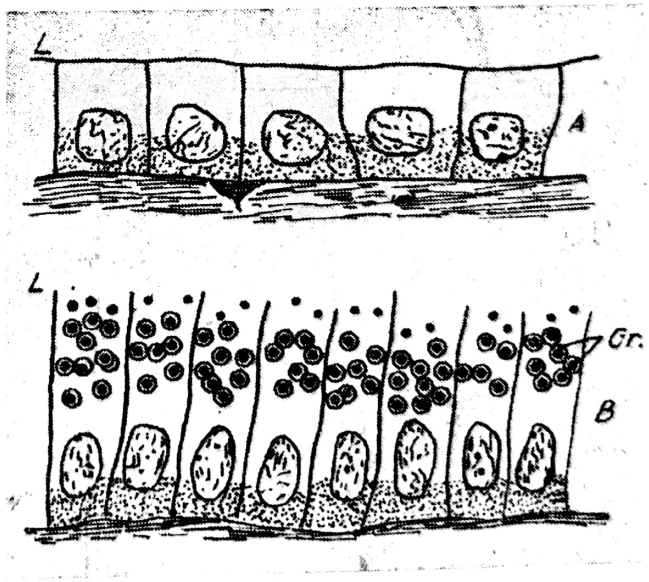
Estradiolul (v. formula) este o dihidroestronă care are atât la C_{17}, cât şi la C_3 gruparea OH; este 3-17-α-estradiol; se găseşte în ovare. Este mai activă decât foliculina şi se crede că ar fi adevăratul hormon folicular. Are doi izomeri posibili, α şi β, care diferă foarte mult în ceeace priveşte activitatea lor hormonală.

Estriolul are un OH în plus la C_6; este un hidrat de foliculină.

O serie de compuşi sintetici derivaţi de stilben au activitate estrogenă remarcabilă.

Progesteronul este hormonul secretat de corpul galben. A fost obţinut sub formă cristalizată şi este considerat ca singurul hormon exclusiv feminin, deoarece ceilalţi hormoni de care am vorbit se găsesc la cele două sexe. S'a reuşit chiar transformarea hormonilor masculini în feminini şi se crede că o asemenea transformare are loc in vivo la nivelul glandei genitale. Analogia de structură chimică între hormonii masculini şi cei feminini explică acest lucru. Estradiolul, prin dehidrogenare, poate fi transformat în testosteron. Testosteronul injectat unui mascul este parţial excretat sub formă de androgen, parţial sub formă de estrogen.

Progesteronul are ca hidrocarbură de bază *pregnanul*, care diferă de androstan prin prezenţa la C_{17} a unei catene laterale etilice; ar fi deci homologul său superior.



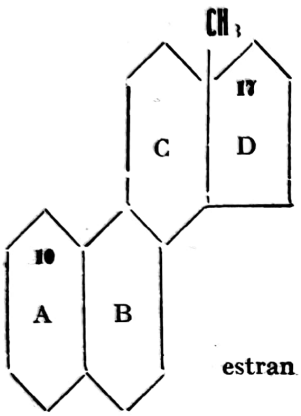
a) Mucoasa glandei seminale la şoarecele mascul castrat.
b) Regenerarea după injecţia de hormon sexual masculin
Gr = granule secretorii; L = lumenul vezicii seminale.

Fig. 59. Testul glandei seminale

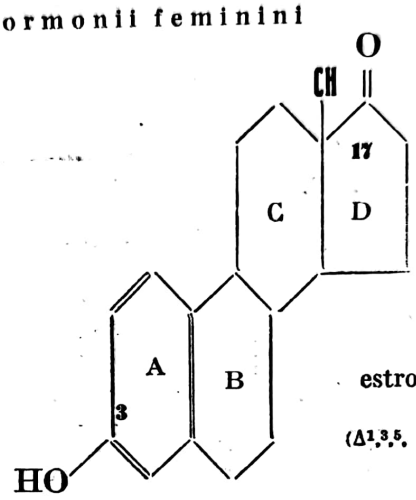
Progesteronul are la această catenă laterală o funcție cetonică. Formula lui brută este $C_{21}H_{30}O_2$, este deci o dicetonă (a doua funcție cetonică este la C_3); poate exista sub forma a doi izomeri, α și β, cu acțiune fiziologică analoagă. Dialcoolul progesteronului are în locul grupărilor cetonice grupări OH; se numește *pregnandiol* și este inactiv din punct de vedere fiziologic (v. formula). Se poate transforma în progesteron. Este excretat conjugat cu acidul glicuronic; progesteronul injectat este eliminat în urină sub formă de glicuronat de pregnandiol.

In terapeutică se utilizează un derivat de progesteron sintetic, *pregneninolon* care are la C_{17} un OH și un radical ≡CH (metinic).

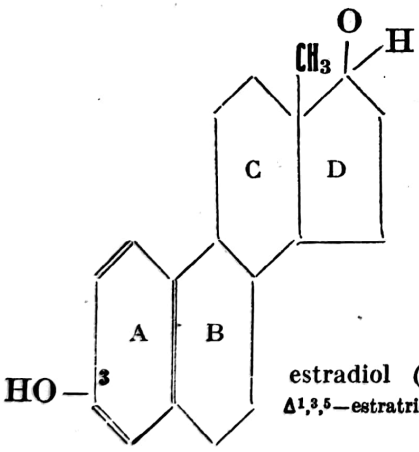
Hormonii feminini



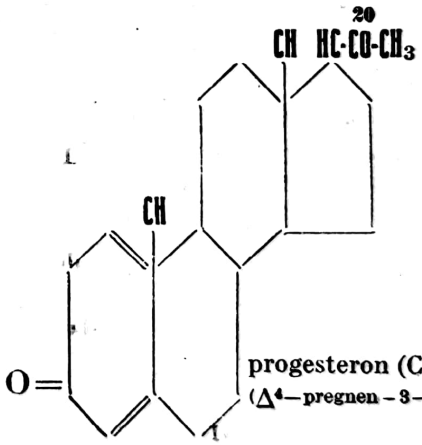
estran



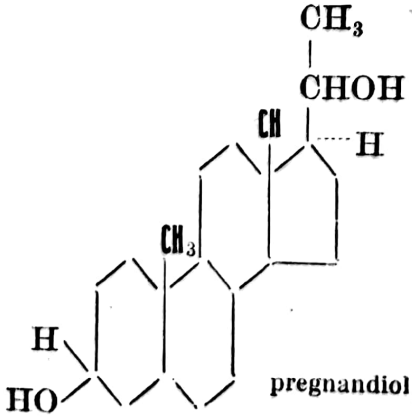
estrona ($C_{18}H_{22}O_2$) sau foliculina
($\Delta^{1,3,5}$, estratrien-3-ol-17-ona)



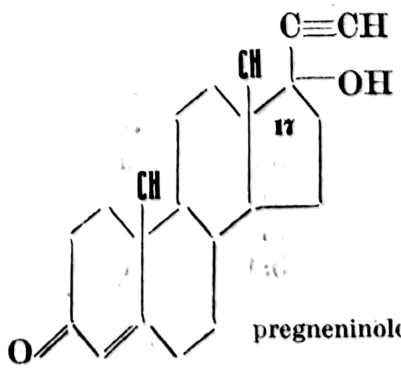
estradiol ($C_{18}H_{24}O_2$)
($\Delta^{1,3,5}$-estratrien-3,17-diol)



progesteron ($C_{21}H_{30}O_2$)
(Δ^4-pregnen-3-20-dion)



pregnandiol



pregneninolon

Relaţia dintre diverşii hormoni sexuali

Am văzut că hormonii masculini şi feminini au o mare analogie de structură şi de acţiune fiziologică. Toţi au acelaş schelet molecular de bază, toţi derivă din colesterol. Acţiunea lor fiziologică este corelată de substituirea la C_{17} şi C_3 din ciclul sterolic a unor grupări cetonice sau oxidrilice. Hormonii foliculari posedă un ciclu (A) aromatic; hormonii testiculari şi cei din corpul galben (progesteronul) au câte o grupare cetonică la C_3; saturarea acestei grupări duce la pierderea activităţii fiziologice. Estrona (foliculina) şi testosteronul se deosebesc între ei prin dispoziţia inversă a funcţiilor cetonică şi alcoolică, dela C_{17} şi C_3, şi în plus estrona are ciclul A complect nesaturat.

Intre testosteron şi progesteron este o şi mai mare analogie structurală: au aceleaşi cicluri, se deosebesc numai prin radicalul dela C_{17}, care în testosteron este o funcţie oxidrilică, iar în progesteron, un radical cu funcţie cetonică. Acestei analogii structurale îi corespund anumite funcţii fiziologice analoage.

Hormon strict specific masculin nu se cunoaşte, toţi au acţiune mixtă. Printre hormonii feminini, singurul hormon strict specific, cu acţiune asupra organelor genitale feminine, este progesteronul, pe când estrona (foliculina) există şi în organele testiculare (la mânz). Există deasemenea foliculine vegetale. Specificitatea acestor substanţe se pare astfel că nu este legată de origina lor, ci de organul asupra căruia lucrează. Este deci vorba de o specificitate a terenului şi nu a hormonului. Intensitatea de acţiune a acestor hormoni e legată de saturarea sau nesaturarea grupărilor cetonice; saturarea acestora duce la o complectă pierdere a activităţii fiziologice. De exemplu, transformarea progesteronului în pregnandiol: prin reducerea grupărilor cetonice, reducere care are loc şi in vivo, atomii C_3 şi C_5 devin asimetrici. Metabolitul esenţial al progesteronului este pregnandiolul inactiv care e excretat în urină conjugat cu acidul glicuronic. Determinarea acestui compus în urină dă indicaţii asupra funcţiei luteinice.

Relaţia dintre hormonii sexuali şi hidrocarburile cancerigene.

Există o serie de fapte experimentale care dovedesc relaţia dintre cancer şi hormonii sexuali.

Unul din agenţii chimici cei mai cancerigeni este *metilcolantrenul*, care produce 100% tumori la şoarece.

Această substanţă se obţine din acidul desoxicolic printr'o serie de procese de oxidare, condensare şi dehidrare. Se cunoaşte strânsa legătură care există între steroli şi acidul desoxicolic.

Se crede că în organismul animal, printr'o deviere a metabolismului normal, s'ar putea împinge mai departe dehidrogenarea ciclului steroliior, ajungându-se la molecula substanţei cancerigene.

O producere patologică a hormonilor sexuali ar putea duce la compuşi cancerigeni.

Lucrări mai recente au arătat deasemenea posibilitatea transformării unor substanţe cancerigene în substanţe hormonale. De exemplu 1, 2, 5, 6-dibenzantracenul poate fi transformat într'o substanţă estrogenă activă ca şi un hormon natural.

Scanned with OKEN Scanner

II. Hormonii corticosuprarenali

Capsulele suprarenale se compun din două țesuturi, embriologic, histologic și fiziologic distincte :

1. medulosuprarenala sau suprarenala medulară și
2. corticosuprarenala sau cortexul. Aceste două componente au origini diferite. La pești sunt separate și spațial. In medulară se formează hormonul adrenalina. Medulara nu are importanță vitală, poate fi extirpată fără să aducă moartea animalului. Cortexul însă are importanță vitală, ablația corticală duce la moartea animalului, ca și extirparea totală a glandelor suprarenale.

Funcția fundamentală a cortexului este aceea de a secreta un amestec de hormoni indispensabili vieții, constituind complexul hormonal cunoscut sub numele de „cortină".

Structura chimică

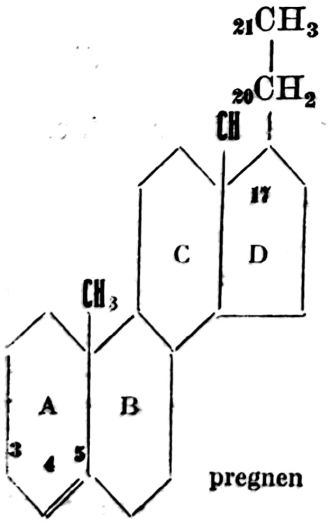
S'au izolat aproape 30 de compuși cu structură steroidă. Toți posedă nucleul sterolic, dar nu toți sunt activi. Numai 6 dintre ei au activitate corticală propriu zisă, alții au activitate androgenă. Cele șase substanțe care pot înlocui în parte funcția corticală se pot împărți în două grupe :

1. *17-hidroxi-11-desoxicorticosteronul* și *desoxicorticosteronul* ;
2. *corticosteronul* ; *17-hidroxi-11-dehidrocorticosteronul* ; *11-dehidrocorticosteronul* și *17-hidroxicorticosteronul.*

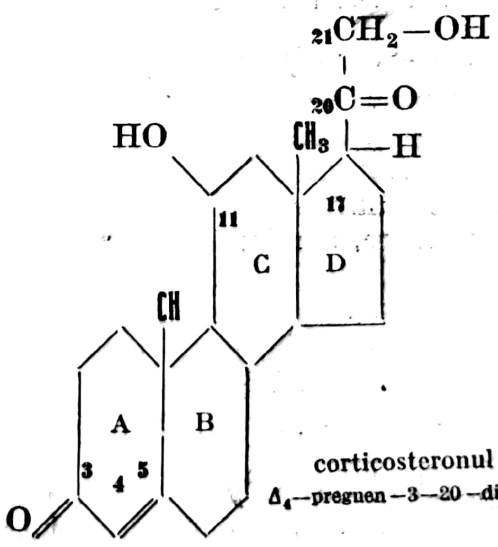
Prima grupă are acțiune asupra metabolismului mineral (săruri și apa) ; a doua grupă, asupra gliconeogenezei, asupra procesului de fosforilare și în general asupra metabolismului glucidelor (are acțiune slabă asupra metabolismului mineral).

Din punct de vedere chimic, toate sunt derivate ale hidrocarburii de bază, pregnanul, respectiv derivatul nesaturat Δ_4 pregnenul [1] (vezi formulele).

Prima grupă este caracterizată prin absența oxigenului substituit la C_{11} ; în a doua grupă, la acest carbon există o grupare hidroxilică sau o grupare cetonică. Toate au însă în catena laterală o grupare cetonică



pregnen

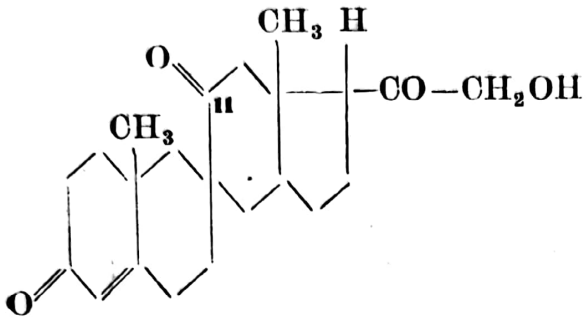


corticosteronul : $C_{21}H_{30}O_4$
Δ_4—pregnen—3—20—dion—11—21—diol

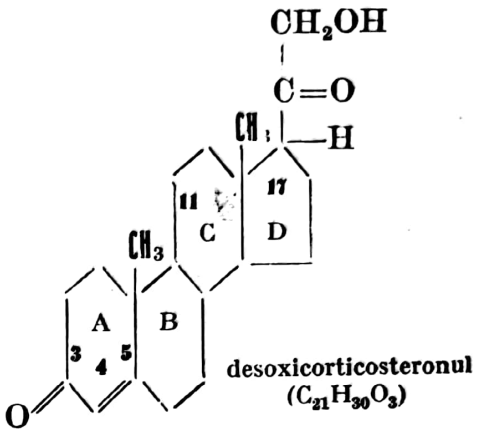
[1] Δ_4 indică legătura dublă, iar indicele, poziția acestei duble legături.

adiacentă la o grupare alcoolică primară. Mai importante sunt corticosteronul și desoxicorticosteronul.

Corticosteronul are formula brută $C_{21}H_{30}O_4$. A fost izolat și identificat primul. Se regăsesc în structura lui nucleii A,B,C și D ai colesterolului, în care funcția de alcool secundar dela C_3 e înlocuită cu o funcție cetonică. Ciclul A are o dublă legătură (între C_4—C_5), conjugată cu gruparea cetonică dela C_3; are la C_{17} o catenă laterală analoagă cu aceea a progesteronului și la C_{11} o funcție OH. Are deci în total două funcții alcoolice și două funcții cetonice, este deci (vezi formula) Δ_4 pregnen-3—20-dion-11—21-diol.

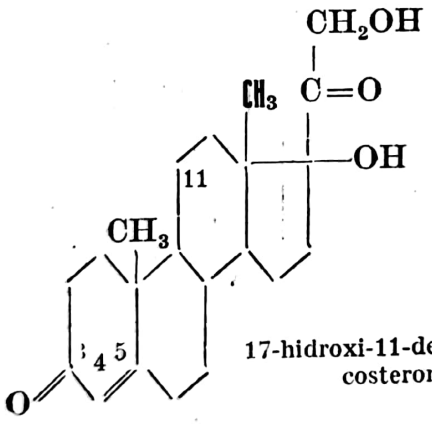


11-dehidrocorticosteronul

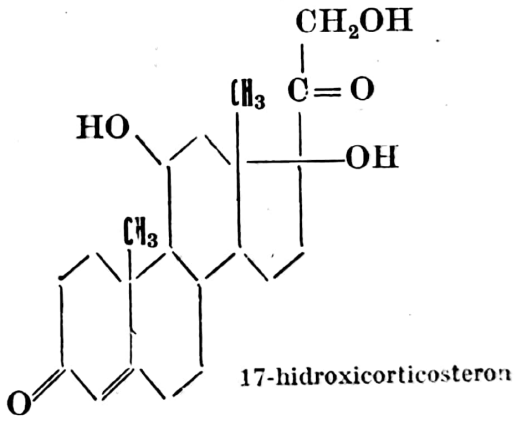


desoxicorticosteronul ($C_{21}H_{30}O_3$)

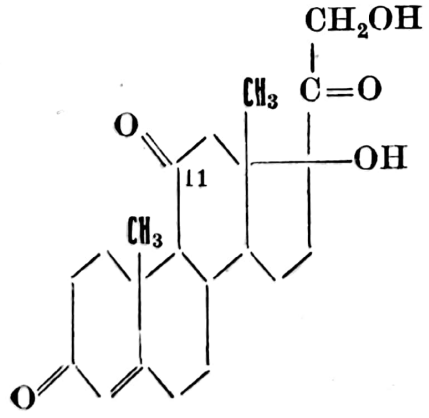
(Δ^4 pregnen—3—20—dion—21—ol)



17-hidroxi-11-desoxicorticosteronul



17-hidroxicorticosteron



17-hidroxi-11-dehidrocorticosteron (cortison)

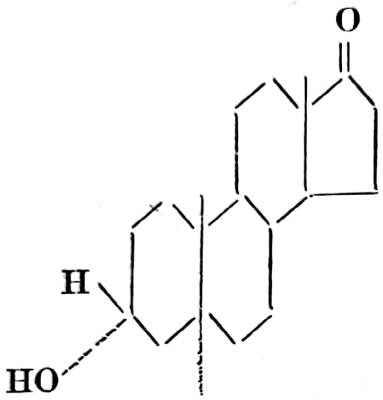
Desoxicorticosteronul are aceeași structură de bază, cu deosebirea că la C_{11} nu are un OH, ci un H în plus. A putut fi sintetizat din stigmasterol.

11—dehidrocorticosteronul are aceeași structură, cu deosebire că la C_{11} are o grupare cetonică; este cunoscut și sub numele de compusul A al lui Kendall.

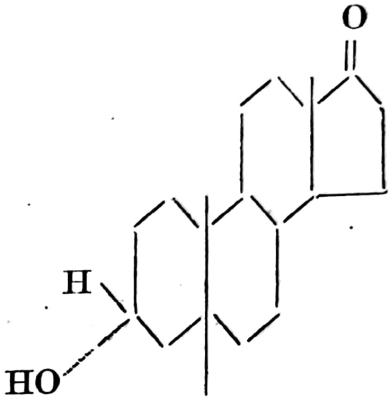
17-hidroxi-11-dehidrocorticosteronul are la C_{11} o funcție cetonică și la C_{17} o funcție oxidrilică (compusul E al lui Kendall).

17-cetosteroizii. Se înțelege sub denumirea de 17-cetosteroizi compușii eliminați în urină având la C_{17} o grupare cetonică.

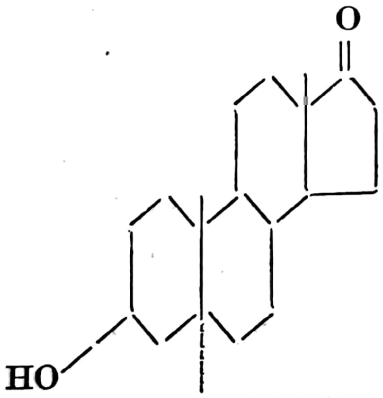
Cei mai importanti sunt : *androsteronul, etiocolanolonul, isoandrosteronul şi dehidroizoandrosteronul* (vezi formulele). Unele au o origină testiculară, altele corticosuprarenală, astfel că determinarea 17-cetosteroizilor poate da o indicaţie asupra activităţii acestor glande. Excreţia medie a 17-cetosteroizilor la mascul între 20—40 de ani e aproximativ 15 mg zilnic, femeile 10 mg zilnic, copiii sub 8 ani mai puţin de 1 mg zilnic. In turburările funcţionale ale glandelor respective se constată o alterare a secreţiei 17-cetosteroizilor. In boala lui Addison scad mult.



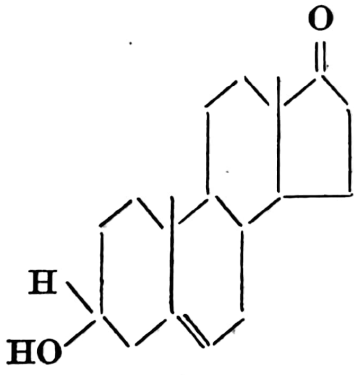
androsteron $C_{19}H_{30}O_2$
(androstan—3 (α)—ol—17 on)



etiocolanolon $C_{19}H_{30}O_2$
(etiocolan—3 (α)—ol—17—on)



izoandrosteron $C_{19}H_{30}O_2$
(androsten—3 . (β) . ol—17—on)



dehidroizoandrosteron $C_{19}H_{28}O_2$
[$^{\Delta^5}$—androsten—3 (β)—ol—17—on
transdehidroandrosteron]

17-cetosteroizii

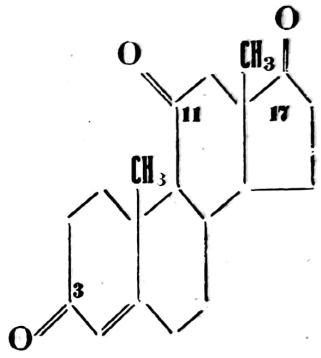
Relaţia dintre structura chimică şi acţiunea fiziologică

Cele şase substanţe cu acţiune fiziologică cortinică au structură chimică analoagă, dar nu identică, şi în legătură cu aceasta prezintă diferenţe în intensitatea şi natura acţiunii lor fiziologice.

Prezenţa unui OH la C_{21} e absolut indispensabilă pentru activitatea cortinică a hormonilor. Aşa se explică dece progesteronul, care se deosebeşte de corticosteron prin absenţa grupării OH la C_{21} şi la C_{11}, nu are acţiune cortico-hormonală. Prezenţa unui oxigen la C_{11} scade activitatea, ceeace explică dece desoxicorticosteronul, care diferă de corticosteron prin lipsa acestui oxigen, este mult mai activ decât acesta. Deasemenea, prezenţa unui OH în plus la C_1-, ca de exemplu în hidroxi-17-corticosteron şi hidroxi-17-dehidro-11-corticosteron, scade activitatea fiziologică.

In rezumat: prezența și poziția unor anumite grupări funcționale influențează remarcabil intensitatea și chiar natura acțiunii hormonale. De exemplu, prezența unui atom de oxigen la C_{11}, fie că e vorba de un OH, fie de o funcție cetonică, orientează acțiunea fiziologică asupra metabolismului glucidic, pe când grupa compușilor desoxi, deci fără oxigen la C_{11}, are acțiune în special asupra metabolismului mineral (săruri și apa).

Astfel, corticosteronul influențează în special metabolismul glucidic, gliconeogeneza, în timp ce desoxicorticosteronul intervine în special în metabolismul sodiului, potasiului, apei — deci acțiunea sa se exercită în special asupra metabolismului electroliților. Prezența funcției de alcool primar la C_{21} din catena laterală este indispensabilă activității cortico-hormonale; aceasta este singura deosebire între structura chimică a progesteronului care nu are activitate cortico-hormonală și, desoxicorticosteron, care are activitate cortico-hormonală intensă.



adrenosteronul

Reducerea dublei legături face compușii total inactivi. Există în corticosuprarenală o serie de compuși fără activitate cortico-hormonală propriu zisă, dar cu activitate sexuală. In special unul din compuși, cu structură analoagă androsteronului și denumit *adrenosteron*, are acțiune net sexuală.

Acest lucru este extrem de important din punct de vedere fiziologic, deoarece lămurește relația care există între hormonii sexuali și hormonii corticosuprarenali, precum și manifestările sexuale consecutive leziunilor capsulelor suprarenale.

Proprietățile fiziologice

Extirparea cortexului duce la moartea animalului. Modificări patologice ale suprarenalei la om duc la afecțiunea cunoscută sub numele de boala lui Addison. Ea se manifestă printr'o serie de simptome caracteristice insuficienței corticosuprarenale: astenie, adinamie, slăbire generală, pigmentație în brun a pielei expusă la lumină, datorită unei acumulări de pigment cutanat, melanina. Repercusiunile acestei boli se exercită asupra diverselor metabolisme. Modificările sanguine sunt caracteristice și precoce. Deficiențele corticosuprarenalei produc: 1) hiperazotemie, 2) desechilibru mineral, scad Na și Cl, crește K (deaceea administrarea de NaCl și dietă săracă în K au efect util). Modificări în metabolismul apei: sângele devine concentrat, circulația încetinită, funcția renală inhibată. Este posibil ca aceasta să fie datorită modificării permeabilității renale. Reglarea echilibrului mineral și în special a echilibrului Na/K apare astfel ca o funcție foarte importantă a hormonului corticosuprarenal și în special a desoxicorticosteronului care produce o creștere a volumului plasmei, a Na și o reducere a K, 3) turburări în metabolismul glucidelor 4) turburări în formarea glucidelor din proteine, 5) turburări în metabolismul grăsimilor, posibil prin acțiunea acestor hormoni asupra fenomenului de fosforilare, 6) modificări ale acțiunii asupra compușilor cu sulf (sinteza glutationului).

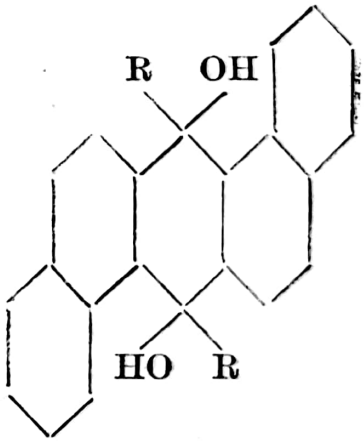
Manifestările şi simptomele caracteristice insuficienţei suprarenale se explică prin intervenţia hormonilor corticosuprarenali în diverse funcţii realizând prin deficit : 1) modificări ale activităţii musculare (cu rezultat adinamia), 2) turburarea funcţiei renale (modificări în permeabilitate), 3) afectarea termogenezei (scăderea temperaturii), 4) modificări ale metabolismului de bază (scădere a arderilor, hipoglicemie), 5) reducerea permeabilităţii capilarelor (deaceea aplicarea lor în arsuri).

In ultimul timp se aplică în practica medicală tratamentul cu 11-dehidro-17-hidroxicorticosteron (cortison) în reumatismul acut şi artrita reumatică. Nu se ştie prin ce mecanism realizează cortisonul efectul său terapeutic clar, deoarece sunt necesare doze mari, peste 100 mg zilnic; nu ar părea să corecteze o deficienţă a hormonilor corticali.

Hormonul adrenocorticotrop (ACTH) al hipofizei, care controlează secreţia hormonală a cortexului prin stimularea formării de adrenosteroizi, are deasemenea acţiune în această boală.

Organizatorul (*în embriologie*)

Organizatorul sau „efectul organizator" este numele dat unei substanţe care ar avea proprietatea să organizeze sau, mai precis, să dirijeze desvoltarea unui organism într'un sens anumit. Această substanţă a fost izolată din ţesuturile embrionare ale tritonului, în special în vecinătatea blastoforului. Sperman a constatat că în jurul gurii primitive există o regiune limitată, cu acţiune de inducţie asupra desvoltării organismului în general. Dacă se taie această regiune şi se implantează invers, are loc o desvoltare inversă, în special a axului nervos; mai mult, dacă se implantează această regiune la un embrion de găină se desvoltă la acesta axul nervos al tritonului, deci această porţiune are rol organizator. Această proprietate se păstrează prin fierberea şi uscarea ţesutului, nu e legată deci de morfologia sa.



Substanţa nu a putut fi izolată, dar a putut fi înlocuită cu unele substanţe sintetice, derivaţi ai dibenzantracenului, având două funcţii de alcool terţiar şi următoarea structură :

Substanţa are toate proprietăţile „organizatorului" şi, ceeace este curios, are proprietăţi cancerigene.

HORMONII CARE CONŢIN AZOT

Aceşti hormoni sunt în genere derivaţi din aminoacizi. Fac parte din această grupă : adrenalina, insulina, tiroxina, hormonul paratiroidian, hormonul hipofizar.

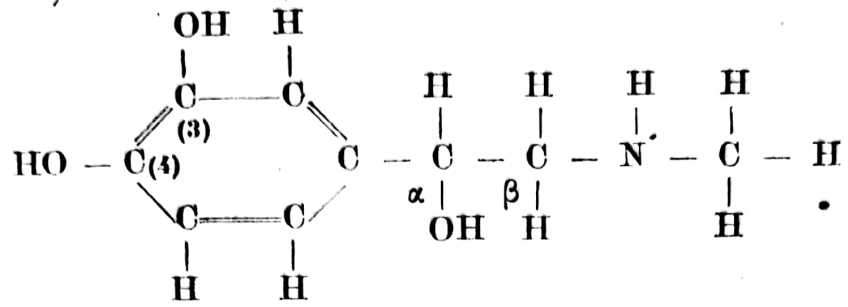
Adrenalina

Adrenalina sau epinefrina este hormonul secretat de medulosuprarenală. Din punct de vedere chimic este o bază azotată, având structură chimică relativ simplă : este un derivat de tirozină. Are formula brută $C_9H_{13}O_3N$, este ›-hidroxi-β-etilmetilamină-3—4-dihidroxifenil.

1. Conţine un nucleu benzenic cu două funcţii fenolice în poziţia orto una faţă de alta.

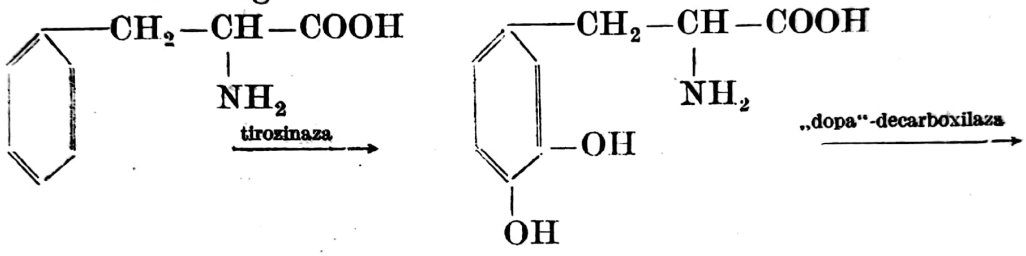
Scanned with OKEN Scanner

2. Conţine o catenă laterală cu un C asimetric în poziţia α la care este fixat un OH; la carbonul β conţine o grupare aminică metilată.



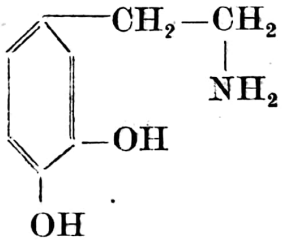
Sunt trei izomeri posibili (levo, dextro şi racemic); forma naturală este levogiră şi de 15 ori mai activă decât forma dextrogiră.

A fost sintetizată din pirocatechină, acid monocloracetic şi metilamină. Este probabil că tirozina şi dihidroxifenilalanina (DOPA) sunt precursorii adrenalinei în organism.



tirozina dihidroxifenilalanina

Noradrenalina (arterenol) este un component normal al organismului, astfel că schema de mai sus, redând formarea adrenalinei în organism, pare să fie verosimilă.

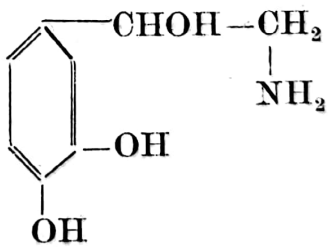


dihidroxifeniletilamina

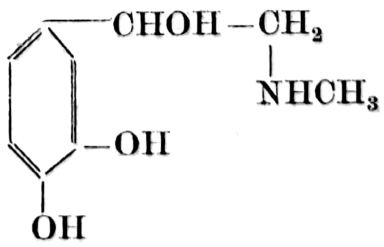
Proprietăţi chimice

Este o substanţă bazică, insolubilă în solvenţi organici şi alcali slabi, formează cu acizii săruri.

Reduce la rece nitratul de argint, amoniacul şi soluţia Fehling la cald. Este extrem de uşor oxidabilă, proprietate pe care sunt bazate metodele de identificare şi dozare pe cale chimică a acestui hormon. Dă colorații caracteristice cu oxidanţii (cu $FeCl_3$ colorație verde, cu persulfat o colorație roşie). In soluţie uşor alcalină prezintă fluorescenţă. In organism este uşor oxidată, astfel că efectul său după administrare pe cale intravenoasă dispare rapid. Produsul său de oxidare, *adrenocromul*, are 4H



noradrenalina (arterenol)



adrenalina

mai puțin decât adrenalina. Trecerea dela adrenalină la adrenocrom este reversibilă și se crede că în acest sens ar lucra ca transportor de hidrogen în oxidațiile celulare.

Acțiunea fiziologică a adrenalinei

Adrenalina își exercită acțiunea sa asupra sistemului nervos simpatic și deci asupra tuturor organelor simpatico-inervate și asupra funcțiilor acestor organe. Are deci acțiune simpaticomimetică. Are acțiune hipertensivă și hiperglicemiantă, deci are acțiune antagonistă cu a insulinei în metabolismul glucidelor, probabil printr'o mobilizare a glicogenului hepatic; secreția de adrenalină și insulină reglează nivelul glicemiei în organismul normal.

efedrina

benzedrina

Există o serie de preparate cu acțiune analoagă adrenalinei, și anume: efedrina, un alcaloid, și benzedrina. Din comparația cu diversele preparate cu acțiune farmacodinamică analoagă reiese că grupările chimice din moleculă, importante pentru acțiunea lor, sunt următoarele:

1. funcția aminică secundară, a cărei activitate este exaltată de prezența grupărilor OH din catena laterală și de ciclul aromatic;
2. poziția β, cea mai favorabilă;
3. funcția de alcool secundar, care mărește foarte mult activitatea;
4. prezența funcției fenolice cu rol de a stimula activitatea;
5. specificitatea stereochimică, și anume sensul rotației optice: forma levogiră este cea mai activă; dextro-adrenalina este de 10 —20 de ori mai puțin activă. Prin sinteză se obține forma racemică, slab activă, din care se poate însă separa forma activă a *l*-adrenalinei, cu ajutorul tartratului optic activ.

Adrenalina poate fi determinată prin metode biologice, în genere prin acțiunea sa asupra tensiunii arteriale sau prin metode chimice.

Insulina

Insulina este cel mai important hormon pancreatic. Este secretată în insulele lui Langerhans, de unde trece în sânge. Izolată din pancreas și purificată, prezintă caracterele chimice ale unei proteine sau, mai exact, ale unui polipeptid. Are greutatea moleculară 35 000. A fost obținută sub formă cristalizată ca sare de zinc (fig. 60), de cobalt, etc. In cristalele de zinc-insulină este o proporție de 0,5% zinc. Depozitarea insulinei în pancreas ar putea fi pusă în legătură cu prezența, în acest organ, a unor cantități destul de mari de zinc. Conține S în cantitate destul de mare (3,5%), cistină 12%. Prin hidroliză în mediu acid este scindată în aminoacizii componenți. Conține aproximativ 16% leucină, 8% fenilalanină, 12% tirozină, 4% histidină, 3% treonină, 2% lizină și 12% cistină ca aminoacizi esențiali; mai conține însă și arginină și prolină.

Scanned with OKEN Scanner

Supusă acțiunii fermenților proteolitici (pepsină, tripsină, catepsină) își pierde activitatea, deaceea insulina nu trebue administrată pe cale bucală.

Grupările indispensabile acțiunii sale sunt grupările disulfidice —S—S—, grupările NH_2, — COOH, fenolice libere. Esterificarea sau acetilarea acestor grupări o inactivează reversibil. Acțiunea fiziologică a insulinei se exercită asupra metabolismului glucidelor. Are rol hipoglicemiant. La animalul depancreatizat restabilește la normal capacitatea de a utiliza glucidele și lipidele prin stimularea depozitării glicogenului în ficat pe seama glucozei sanguine. Vom vedea la capitolul asupra metabolismului glucidelor, în detaliu, etapele în care intervine acest hormon de reglare a nivelului glicemiei.

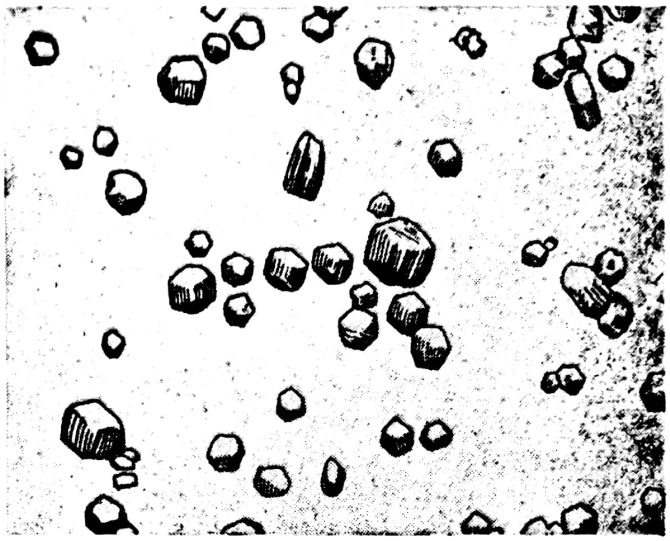
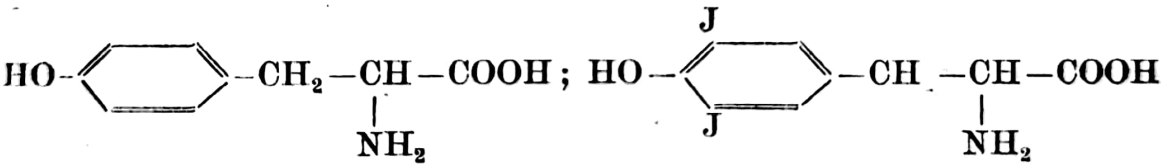


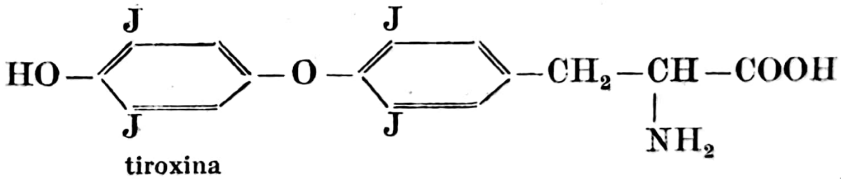
Fig. 60. Cristale de zinc — Insulină.

Tiroxina

Tiroxina este produsul de secreție al glandei tiroide. A putut fi sintetizată (1927) și constituția sa este lămurită: este un derivat de diiodotirozină.



tirozina diiodotirozina



tiroxina
(3,5 ; 3,5 — tetraiodotirozina)

Conține un C asimetric și deci e optic activă: forma naturală e levogiră, produsul sintetic e racemic. In glanda tiroidă se găsește combinată cu o proteină, constituind tireoglobulina, care prin hidroliză eliberează tiroxina. Tiroxina e un compus cristalizat, alb, care dă în soluții reacțiile aminoacizilor. Acțiunea sa fiziologică este complexă. Pare a fi un stimulent al tuturor proceselor metabolice, ar controla creșterea și oxidațiile din organism (fig. 61, 62). Experiențe cu iod radioactiv arată că glanda tiroidă fixează iodul din sânge pentru sinteza diiodotirozinei și apoi a tiroxinei. Reacția e inhibată de sulfonamide, tiouree, tiouracil. Sinteza

Scanned with OKEN Scanner

Stânga: iepure normal *Dreapta*: două animale operate

Fig. 61. Efectul tiroidectomiei asupra creşterii iepurilor tineri

tiroxinei în organism se petrece probabil în mai multe etape: 1) concentrarea iodului, 2) oxidarea şi combinarea lui cu tirozina, 3) cuplarea oxidativă a două molecule de diiodotirozină, probabil sub acţiunea unor enzime de oxidoreducere, a unor peroxidaze.

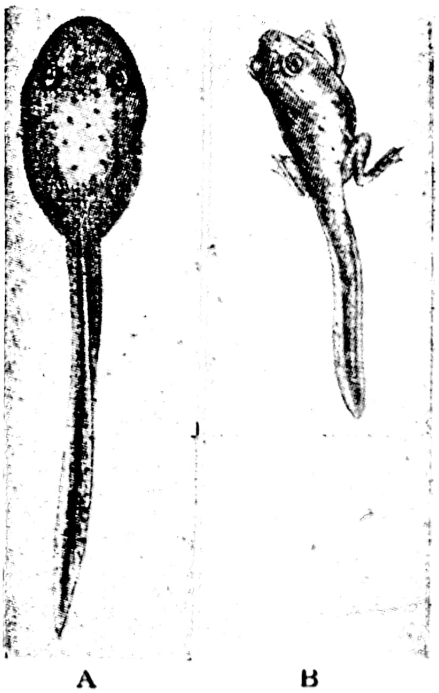
Hormonul tireotrop din glanda pituitară ar fi necesar pentru realizarea acestei sinteze.

Deficienţa în activitatea tiroidei produce un edem, metabolism bazal scăzut. Creşterea activităţii produce boala cunoscută sub numele de guşă exoftalmică (metabolism bazal crescut, exoftalmie, etc.).

Hormonii paratiroidieni

Hormonii paratiroidieni sunt secretaţi de paratiroidă. Sunt de natură proteinică şi deci distruşi de enzimele proteolitice. Fenomenele care apar în urma extirpării paratiroidelor sunt foarte caracteristice: fenomene tetanice (tetania paratireoprivă) datorită probabil unui desechilibru în metabolismul calciului. Calciul sanguin scade sub 7 mg%; Panorganic în sânge creşte dela 5 mg% la 6—8 mg%, iar excreţia urinară a Ca şi P este redusă, aceasta fiind o cauză a hiperexcitabilităţii musculare care se manifestă în tetanos; aportul de hormon creşte calcemia. Calciul mobilizat de hormonul paratiroidian provine din oase şi este probabil că acest hormon stimulează activitatea osteoblastelor. In tratamentul prelungit cu aceşti hormoni sau în tumori ale paratiroidei, oasele sunt demineralizate, devin fibroase. Doza terapeutică administrată unui individ normal sau în hipoparatiroidism creşte slab secreţia P şi Ca; scade P din ser şi creşte calciul.

Fig. 62. B) Efectul tiroidectomiei asupra desvoltării mormolocului de broască; A) broaşte normale de aceiaşi vârstă.



A B

Hormonii hipofizari

Hormonii hipofizari sunt puţin cunoscuţi din punct de vedere chimic. Se cunosc însă multiple tipuri ale efectului fiziologic, corelat cu glanda pituitară şi care se atribuie unor hormoni distincţi: hormonul de creştere, hormonul tireotrop, adrenocorticotrop, gonadotrop şi lactogen, cetogen, glicotrop (antagonist cu insulina), diabetogen, paratireotrop, pancreatotrop. Acţiunile hipofizei anterioare pot fi împărţite în două grupe:

Scanned with OKEN Scanner

acțiune asupra creșterii (fig. 63), secreției laptelui, metabolismelor și acțiune asupra altor glande endocrine.

Hormonul tireotrop stimulează hormonul tiroidian; absența sa produce atrofia tiroidei.

Hormonul adrenocorticotrop (ACTH) este foarte important. Hipofizectomia duce la atrofierea cortexului suprarenal.

a. câine normal; *b.* câine hipofizectomizat.

Fig. 63. Câine în vârstă de 3 săptămâni.

Intr'un extract preparat din pituitara anterioară s'a izolat (1942) o proteină pură cu acțiune corticotropă intensă, cu o greutate moleculară de 20 000 și pH izoelectric 4,7—4,8. ACTH produce modificări profunde în conținutul în acid ascorbic și în colesterol al cortexului; această acțiune fiind specifică, sugerează că precursorul corticosteroizilor este colesterolul.

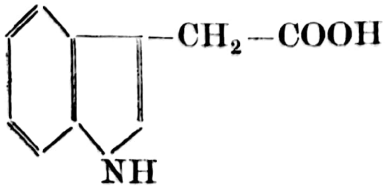
Factorul diabetogen, secretat de lobul anterior al hipofizei, inhibă acțiunea insulinei asupra glucozei sanguine și asupra depozitării glicogenului muscular și tinde astfel să ridice nivelul glicemiei. Cercetările ultime indică o acțiune intensă de inhibare exercitată de acest factor asupra hexokinazei, enzimă care intervine în fosforilarea glucozei. Inhibarea duce la o depozitare subnormală și la o metabolizare subnormală a glucozei. Insulina are tocmai rolul să înlăture acest inhibitor al hexokinazei.

Hormonii secretați de această glandă sunt de natură proteinică, instabili la căldură, distruși de enzimele proteolitice.

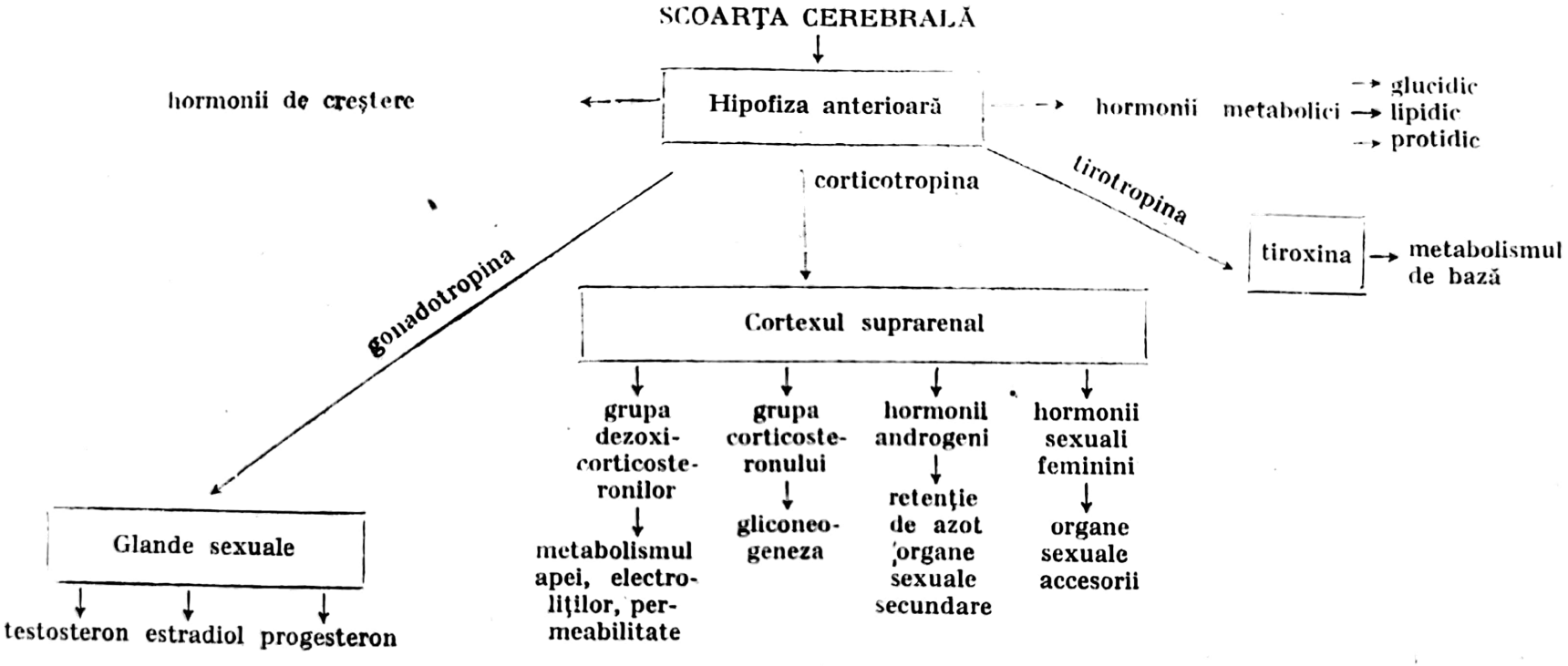
Hormonii tisulari

Sunt o serie de substanțe foarte active, care nu sunt însă formate în organe specializate, ci în diverse țesuturi. Intre acești hormoni tisulari se clasifică: *histamina, colina, acetilcolina, adenozina,* acestea din urmă clasificate de alți autori în grupa vitaminelor. Au drept caracter comun faptul că scad tensiunea arterială.

Fitohormonii sau hormonii vegetali



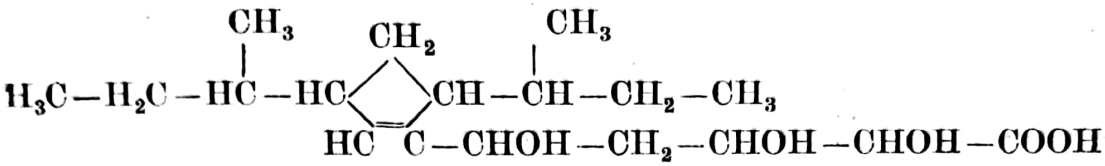
Printre fitohormoni s'au studiat în special hormonii de creștere, auxinele. Aceștia nu ar lucra direct, ci indirect, prin activarea substanțelor de creștere. Se cunosc două tipuri de auxine, a și b, derivați ai ciclopentenului. O



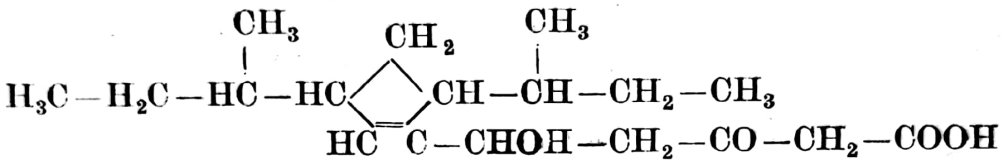
Relația funcțională dintre diversele glande endocrine

Scanned with OKEN Scanner

heteroauxină ar fi identică cu acidul β-indolilacetic şi ar influenţa creşterea rădăcinilor. Origina heteroauxinei ar fi triptofanul.



Auxina a



Auxina b

Relaţia funcţională dintre glandele endocrine

Activitatea endocrină a unei glande oarecare este corelată cu activitatea endocrină a celorlalte glande, iar toate sunt sub controlul scoarţei cerebrale. Activitatea tiroidei, cortexului suprarenal, gonadelor, este controlată de lobul anterior al hipofizei (pituitara anterioară).

Hipofiza anterioară este la rândul ei controlată de către hormonii secretaţi de tiroidă, gonade, etc., şi direct de sistemul nervos. Hipofiza posterioară şi medulo-suprarenala sunt sub controlul nervos direct. In general, un organ sau chiar un proces metabolic, este reglat de o serie de hormoni şi nu numai de unul singur. O schemă a acestor corelaţii este dată alăturat.

Partea III

ENZIMELE

Enzimele sau *fermenţii sunt componenţi chimici care catalizează reacţiile de sinteză şi degradare din substanţa vie. Enzimele sunt astfel biocatalizatori care joacă un rol fundamental în reglarea proceselor metabolice, precum şi în toate procesele de creştere şi regenerare tisulară.* Prin acţiunea lor catalitică, enzimele fac posibilă, în condiţii compatibile cu viaţa, realizarea unei întregi serii de reacţii chimice, care in vitro nu se pot realiza decât în condiţii incompatibile cu viaţa celulară. De exemplu: degradarea proteinelor in vitro se poate face la 37°, dar numai în mediu puternic acid şi în interval de 3 luni; în organism, în stomac, această degradare are loc extrem de rapid şi în mediu mult mai slab acid. Pentru a realiza in vitro tot atât de repede această degradare e necesară o temperatură de 140°, o presiune mare (la autoclav) şi o mare aciditate, deci condiţii absolut incompatibile cu viaţa organismelor. Acelaş lucru e adevărat pentru cele mai multe din reacţiile care au loc în cursul digestiei: hidroliza amidonului, saponificarea grăsimilor, oxidoreducerile. Cu ajutorul enzimelor

Scanned with OKEN Scanner

celula poate realiza aceste reacţii la temperatura corpului, la aproximativă neutralitate şi cu viteză mare. Viteza proceselor de asimilaţie şi desasimilaţie e dependentă de cantitatea fermenţilor şi de activitatea lor în celule. Rolul enzimelor e fundamental în procesele vieţii, iar studiul acestora apare astfel ca problema centrală a biochimiei.

Studiul enzimelor a început curând după cunoaşterea fenomenelor de cataliză. *Kirchoff* (în 1815) a arătat că extractul de malţ are proprietatea să transforme amidonul în zahăr. *Payen* şi *Persoz* (1833) au reuşit să separe principiul activ din malţ sub forma unei pudre albe amorfe, solubilă în apă şi care la 65° poate transforma o cantitate de fecule de cartofi de 2 000 de ori mai mare decât greutatea sa. Aceşti cercetători au precipitat primul ferment adevărat şi i-au dat numele de „diastază", comparându-l cu fermenţii naturali care înăcresc laptele, vinul, etc.; acesta a fost punctul de plecare pentru identificarea unui mare număr de principii active: pepsina din sucul gastric, emulsina din migdalele amare, tripsina din sucul pancreatic, lipaza, toate reunite, sub numele de diastaze. Marele lor număr a arătat cât de răspândiţi sunt aceşti corpi. Berzelius introduce termenul de cataliză pentru a descrie fenomene de asemenea natură.

Intre 1850—1870, *Pasteur* a arătat că fermentaţia naturală este datorită creşterii microorganismelor şi introduce noţiunile de *ferment solubil* sau nefigurat (de exemplu, pepsina din sucul gastric, diastaza din extractul de malţ) şi ferment figurat, care ar fi o fiinţă vie. *Büchner*, prin experienţe de izolare a zimazei, rămase clasice, arată că nu se poate face această distincţie. In 1870, *Kühne* introduce termenul general de *„enzimă"*.

Din 1900, studiul enzimelor ia o mare extindere prin purificarea acestora şi studierea mecanismului lor de acţiune. Aceasta constitue faza descriptivă în studiul enzimelor, cuprinzând descrierea şi clasificarea lor, căreia îi urmează studiul mecanismelor acţiunilor enzimatice şi explicarea acestor mecanisme pe baze chimice şi fizico-chimice. Aceste cercetări au fost făcute în special in vitro, pe enzimele izolate din celule, metodă fără îndoială necesară în faza iniţială a cercetărilor, dar care avea defectul de a nu da imaginea absolut reală a fenomenului în însăşi celula vie. Savanţii sovietici, în frunte cu *A. N. Bach*, întemeietorul şcolii enzimologice sovietice şi cu *Palladin*, au iniţiat studiul enzimelor in vivo în însăşi celula vie. Această metodă de cercetare mai este legată şi de numele altor savanţi sovietici, ca *A. Oparin*, *A. Cursanov*, *B. Rubin*, *N. Sisachian*, savanţi care au adus contribuţii de bază în studiul enzimelor.

Definiţia enzimei. Haldane dă următoarea definiţie a enzimei: enzima e un catalizator *organic, solubil* şi *coloidal, produs de celula vie* sau, mai schematic, e un catalizator: *biologic, solubil* şi *coloidal*.

Este *biologic*, deoarece este produs în organismul viu.

Este *solubil*, deoarece se găseşte în organism în stare de soluţie.

Este *coloidal*, deoarece, având o moleculă mare, acest lucru îi conferă proprietăţile caracteristice stării coloidale.

Enzimele pot fi produse numai de substanţe vii. Nu s'au putut sintetiza până acum în laborator.

Deşi sinteza lor se face *numai în interiorul organismului, ele îşi pot exercita acţiunea lor enzimatică atunci când sunt extrase din organism.*

Locul de producere a enzimelor. In celulă, enzimele nu sunt izolate de componenţii celulari. Ele se găsesc fie absorbite pe anumite structuri

Scanned with OKEN Scanner

celulare citoplasmatice şi nucleare, fie dispersate omogen în protoplasmă şi sucurile celulare. Va exista astfel un schimb continuu de influenţe reciproce între componentele celulare şi activitatea enzimelor.

Producerea enzimelor la organismele superioare este localizată în anumite organe şi chiar în anumite celule ale unui organ. Astfel, pepsina se formează numai în mucoasa gastrică, tripsina numai în pancreas. Lipaza se găseşte în mare cantitate în pancreas, în cantitate mai mică în mucoasa gastrică, în intestinul subţire, în ţesuturile adipoase. Ficatul e bogat în esteraze, arginază. Cu ajutorul histochimiei enzimatice s'a putut constata că localizarea enzimelor în diversele organe e legată de anumite celule din aceste organe, de exemplu, în stomac, pepsinogenul, forma inactivă a pepsinei, e fabricată de anumite celule din mucoasa stomacală, iar HCl, care face transformarea formei inactive în pepsină activă, e fabricat de alte celule, şi anume de celulele parietale ale stomacului. Mai mult chiar, s'a constatat că în aceeaşi celulă repartiţia enzimelor nu este uniformă, ci este legată chiar de anumite elemente structurale morfologice bine definite, de exemplu *mitocondriile*, organite morfologice şi entităţi fizice, care se colorează intravital cu verde Janus. S'a reuşit în ultimii ani (1943) izolarea in vitro a mitocondriilor din limfosarcomul de şobolan conţinând condriomul şi microzomii, fiecare din acestea fiind sediul unei activităţi enzimatice intense. Astfel, *Joyet-Lavergne* a arătat că sediul enzimelor de oxidoreducere este condriomul care conţine oxidaze, peroxidaze, glutation, vitamina A.

Microzomii au o structură nucleoproteinică şi conţin citocromoxidaze, deshidraza lactică şi succinică, citocromul C, carboxilaza, hidrolaze, fosfataza alcalină, arginaza.

Lucrările cercetătorilor sovietici *Engelhardt* şi *Liubimova*, de o importanţă crucială în structura enzimelor, arată că o substanţă structurală poate avea şi rol de enzimă : miozina musculară poate cataliza scindarea unei molecule de acid ortofosforic din molecula acidului adenozintrifosforic. Este o reacţie de scindare care joacă un rol fundamental în mecanismul de degradare a glucidelor în muşchi, respectiv în energetica contracţiei musculare.

Enzimele în organism. (*Starea sub care se găsesc*). După uşurinţa cu care se pot extrage enzimele din celule se face distincţia între exoenzime, endoenzime şi desmoenzime. Se înţelege sub numele de exoenzime enzimele care, deşi secretate în celule, sunt eliminate în lichidele din organism şi îşi exercită acolo acţiunea lor. De exemplu : enzimele salivare, enzimele din sucul intestinal, pancreatic, stomacal, din plasma sanguină. Enzimele din aceste lichide sunt identice cu cele produse în celulele respective la locul lor de producere şi se pot extrage cu uşurinţă din aceste celule.

Endoenzimele sunt enzimele care îşi exercită acţiunea lor chiar în celulele în care sunt secretate. Ele sunt absorbite pe scheletul celular şi nu pot fi extrase din celule în mod direct, ci numai printr'o distrugere mecanică a lor (de exemplu prin frecare cu nisip de cuarţ) ; odată extrase din celule în diverşi solvenţi (apă, glicerină, etc.), aceste enzime sunt însă tot atât de active ca şi în celula intactă.

Desmoenzimele sunt enzimele legate mai profund de celule, de protoplasma celulară, şi anume, prin legături chimice. Nu pot fi extrase nici direct, nici prin simpla distrugere mecanică a scheletului celular, ci numai

Scanned with OKEN Scanner

după o autoliză a substanței celulare. După autoliză, desmoenzima se poate extrage cu apă sau cu alți solvenți (glicerol); ea rămâne activă și în afara celulei. In ultimul timp, clasificarea aceasta a fost înlocuită cu o clasificare în două grupe, și anume, grupa enzimelor *extracelulare* și grupa enzimelor *intracelulare*.

MECANISMUL DE ACȚIUNE AL ENZIMELOR

Mecanismul general de acțiune al enzimelor este acela al tuturor catalizatorilor. Sunt active în concentrații extrem de mici; între concentrație și intensitatea acțiunii lor există o disproporție; nu se consumă în timpul acțiunii lor, nu modifică starea finală de echilibru a reacției catalizate, modifică numai viteza cu care se atinge acest echilibru, și anume, crește viteza reacției. Creșterea vitezei unei reacții sub acțiunea unei enzime se explică, de altfel ca și pentru ceilalți catalizatori, prin coborîrea nivelului minim necesar unei transformări moleculare date, deci prin coborîrea nivelului „energiei de activare". Viteza unei reacții chimice este determinată de frecvența cu care moleculele care reacționează depășesc un anumit nivel minim de energie necesar ca această reacție să se poată produce. Enzima care activează o reacție de transformare a unui substrat dat va coborî deci nivelul minim de energie necesar acestei reacții, va realiza ceeace se numește o labilizare a substratului. Problema care se pune este deci aceea a mecanismului prin care enzima realizează această labilizare. Michaelis și Menten (1913) admit și pentru enzime *teoria reacțiilor intermediare*, care explică acțiunea de coborîre a energiei de activare, de labilizare a substratului prin formarea unor compuși intermediari între substrat și enzimă. Aceștia sunt nestabili, se desfac cu ușurință, eliberând din nou enzima ca atare, iar substratul, sub o formă labilizată, devine capabil să reacționeze la un nivel al energiei de activare mai mic decât cel necesar în absența enzimei. Intr'o reacție enzimatică care duce la transformarea unui substrat S într'un compus X sub acțiunea catalitică a enzimei E au loc astfel următoarele etape: $E + S \rightleftarrows ES \rightleftarrows E + A$, unde ES este compusul intermediar format.

Viteza de formare și de desfacere a complexului enzimă-substrat (ES) este extrem de mare și se punea problema dacă legătura dintre substrat și enzimă este datorită unui fenomen de absorbție sau unei combinații chimice.

Problema aceasta este însă oarecum formală, deoarece înseși fenomenele de absorbție se pot interpreta ca reacții chimice realizate prin anumite legături de valență. Caracterul de specificitate al enzimelor pledează pentru un complex intermediar între substrat și enzimă. Studii de cinetică a reacțiilor enzimatice-catalizate pledează deasemenea pentru formarea unor complexe intermediare. Experimental nu s'a reușit punerea în evidență a acestora decât în foarte puține cazuri. Astfel s'a arătat pe cale spectroscopică (Leilin) formarea unui complex între peroxidază și apa oxigenată. Dacă se pune în contact peroxidaza, o hemin-enzimă, cu H_2O_2 și un donator de hidrogen adecvat (pirogalolul), are loc reacția de reducere a apei oxigenate și de oxidare a pirogalolului. Se constată că spectrul de absorbție caracteristic peroxidazei este modificat odată cu coloratia soluției de peroxidază. In loc de patru benzi de absorbție (645, 583, 548 și 498 mμ) apar numai două, cu alte poziții (561 și 530,5 mμ); aceste benzi sunt stabile

Scanned with OKEN Scanner

în absența acceptorului de oxigen (pirogalolul) și dispar, formând din nou cele patru benzi inițiale, în prezența acestuia, de unde rezultă că a avut loc o reacție între substrat și enzimă. Cantitatea de H_2O_2 necesară pentru a transforma întreaga enzimă în noul compus este de o moleculă de H_2O_2 pentru fiecare atom de Fe-peroxidază. Rezultate analoage au fost obținute și în cazul catalizei. Aceste rezultate confirmă teoria lui Michaelis-Menten a reacțiilor intermediare. Autorii citați mai admit că acestor reacții li se aplică legea acțiunii masselor, calculând cu ajutorul acesteia constanta de disociere a combinației intermediare enzimă-substrat. Se admite că viteza reacției este determinată în fiecare moment de concentrația enzimei (fig. 64) și a substratului său.

In cazul reacției
$$E + S \rightleftarrows E\,S$$
$$ES \rightarrow P + Q$$

unde E = enzima, S = substratul, P și Q = produsele rezultate din S sub acțiunea catalitică a enzimei E.

Dacă e este concentrația totală a enzimei și dacă o cantitate p este fixată în complexul $E\,S$, concentrația enzimei libere va fi (e—p). Viteza de reacție v este viteza cu care se formează produsul intermediar și este proporțională cu concentrația p a compusului intermediar nestabil $E\,S$.

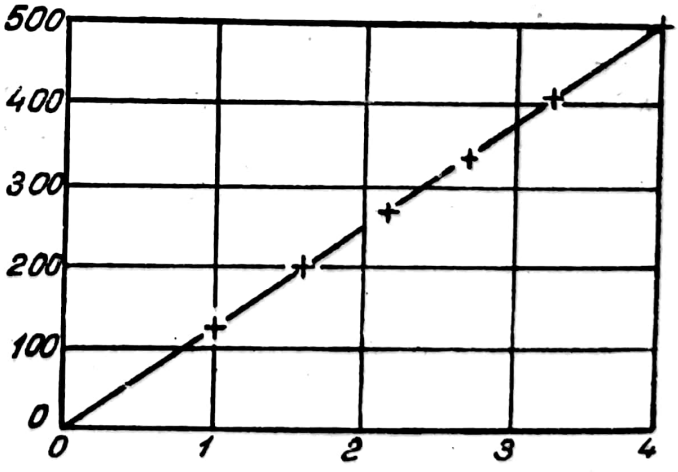
Reacția este următoarea : $\underset{(e-p)}{E} + \underset{x}{S} \rightleftarrows \underset{p}{E\,S}$

unde $e - p$, x și p sunt concentrațiile moleculare. Dacă v este viteza reacției de formare a compusului intermediar, atunci $v = x\,(e - p)\,K_1$ iar pentru reacția reversibilă $v = p\,K_2$ unde K_1 și K_2 sunt constantele vitezelor de reacție într'un sens și în sens invers.

Când sistemul este în echilibru

$$x\,(e - p)\,K_1 = p\,K_2 \quad \text{sau} \quad \frac{x\,(e - p)}{p} = \frac{K_2}{K_1} = K\,m \qquad (1)$$

unde Km este constanta Michaelis ce caracterizează cantitativ o enzimă dată și reprezintă după cum vom vedea valoarea concentrației substratului pentru care în prezența unei cantități de enzimă viteza de reacție atinge jumătate din valoarea sa limită. Această constantă diferă dela enzimă la enzimă și dela substrat la substrat. Evaluarea concentrațiilor enzimei (c) și ale complexului enzimă-substrat (p) este foarte rar posibilă, deaceea aceste valori trebue înlocuite în formulă



In ordonată : mg. zahăr invertit format
In abscisă : cc. sol. zaharază.

Fig. 64. Influența concentrației enzimei (zaharaza din drojdia de bere)

prin alți factori care se pot determina. Viteza (v) de descompunere a complexului $E\,S$ va fi proporțională cu concentrația acestui complex : $v = Kp$ (2), unde K este o constantă. De aici rezultă că $p = \frac{K}{v}$, valoare care se poate înlocui în formula (1).

In ceeace privește c se poate face o ipoteză valabilă, și anume că x (concentrația substratului) este mult mai mare decât c (concentrația enzimei), astfel că se poate socoti că întreaga cantitate de enzimă este transformată în $E\,S$ când p devine egal cu c. Viteza de reacție v este proporțională cu p și, în prezența unui mare exces de substrat, p (concentrația complexului $E\,S$) devine egală cu concentrația enzimei c. Deci, în prezența unui exces mare de substrat, viteza de reacție va atinge o valoare limită care se va nota cu V.

Pentru acest caz special $v = V$ și $V = K\,c$ (3)

Divizând (2) cu (3) se obține : $\frac{v}{V} = \frac{p}{c}$ (4)

și ecuația $x\,(c - p) = pK\,m$ se poate scrie $e\,x - px = pK\,m$ $cx = px + pK\,m$; $x = \frac{p}{c}\,(x + K\,m)$; înlocuind raportul p/c cu v/V în ecuația (4), relația devine $x = \frac{v}{V}\,(x + K\,m)$ sau $v = \frac{Vx}{x + K\,m}$ (5)

ecuație care indică relația vitezei de reacție cu concentrația x a substratului S și unde v = viteza de reacție inițială, S = concentrația substratului, V = valoarea limită a vitezei v spre care tinde viteza de reacție la concentrații foarte mari ale substratului, iar *constanta Km, așa numita constantă Michaelis, este egală cu concentrația substratului pentru care viteza de reacție este egală cu jumătate din viteza limită.*

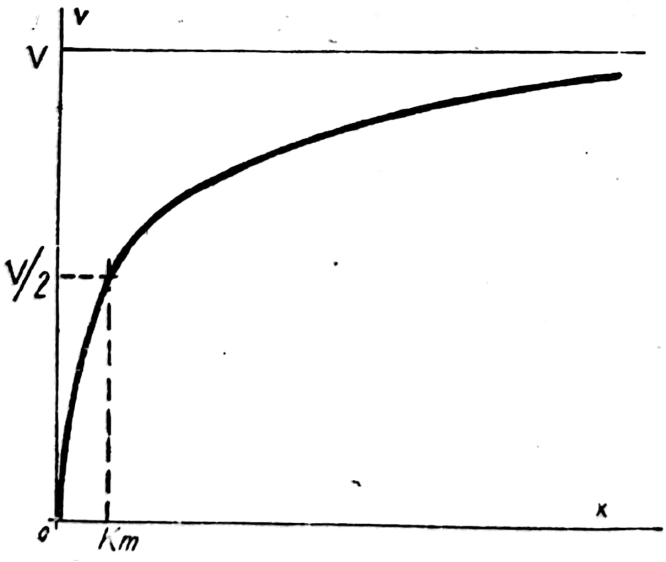
Dacă în acest caz punem $v = \frac{V}{2}$ și înlocuim în ecuația (5) atunci

$\frac{V}{2} = \frac{Vx}{x + K\,m}$ sau $\frac{1}{2} = \frac{x}{x + K\,m}$

sau $2x = x + Km$ sau $x = K\,m$.

Relația $V = \frac{V\,x}{x + K\,m}$

poate fi reprezentată grafic printr'o hiperbolă dreptunghiulară în care viteza limită V este valoarea asimptotică spre care tinde viteza de reacție pentru concentrații mari ale substratului și $K\,m$, constanta Michaelis corespunde concentrației pentru care viteza este egală cu jumătate din viteza limită (fig. 65).



$V = \frac{Vx}{X + Km}$ unde V = viteza inițială de reacție, X = concentrația substratului

Fig. 65. Curba teoretică a ecuației Michaelis

Scanned with OKEN Scanner

Curbele experimentale obţinute, de exemplu în cazul zaharazei, au aceeaşi imagine ca şi curba obţinută teoretic, fapt care susţine teoria lui Michaelis. Relaţia $v = Kc$, care indică proporţionalitatea dintre viteza limită şi concentraţia enzimei este deasemenea în acord cu datele experimentale. Concordanţa dintre *rezultatele experimentale şi cele teoretice justifică ipoteza formării unui produs intermediar nestabil între enzimă şi substrat*, ipoteză care stă la baza consideraţiilor teoretice de mai sus. Valoarea constantei $K\,m$ indică afinitatea enzimei pentru substrat: o valoare $K\,m$ mare indică o activitate mică între substrat şi enzimă, şi invers, deci această constantă dă o valoare numerică a afinităţii enzimă-substrat.

PROPRIETĂŢILE GENERALE ALE ENZIMELOR

Enzimele au în primul rând caracterele generale ale catalizatorilor şi anume:

a) *modifică viteza unei reacţii fără ca ele înseşi să se consume*;

b) *cantităţi minime de enzimă pot produce transformarea unor cantităţi foarte mari de substrat.*

De exemplu: o moleculă de catalază descompune într'o secundă 100 000 molecule de apă oxigenată; o parte invertază dedublează 200 000 părţi zaharoză;

c) *acţiunea enzimelor este reversibilă*, ca şi a celorlalţi catalizatori neenzimatici. Conform legii acţiunii masselor, care se aplică reacţiilor reversibile catalizate de către enzime, catalizatorul nu poate modifica echilibrul, ci numai viteza cu care se atinge acest echilibru. Acţiunea enzimei trebue deci să se exercite atât asupra reacţiei de descompunere, cât şi asupra aceleia de sinteză.

Exemplul clasic este acela al hidrolizei unui ester

$$CH_3\text{-}COOH + C_2H_5.OH \rightleftarrows CH_3\,COOC_2H_5 + H_2O$$

acid + alcool ⇄ ester + apă

La echilibru, legea masselor dă: $\dfrac{(acid)\qquad(alcool)}{(ester)\qquad(apă)} = K$

La echilibru, K are o valoare fixă în funcţie numai de temperatura de reacţie şi independentă de viteza cu care se realizează acest echilibru. Reacţia duce la aceeaşi stare de echilibru în prezenţa unui acid mineral diluat, fie că se foloseşte un catalizator biologic, fie că se petrece în absenţa oricărui catalizator; viteza cu care se realizează acest echilibru este însă diferită. Enzima influenţează atât viteza reacţiei de degradare, cât şi a aceleia de sinteză, deci reacţiile de hidroliză şi de esterificare, astfel că, dacă se pun în contact produsele de hidroliză, se poate realiza în prezenţa enzimei o sinteză, o esterificare, deoarece enzima accelerează reacţia care tinde să realizeze starea de echilibru final. Reversibilitatea acţiunii esterazice se poate reda grafic în felul următor (fig. 66):

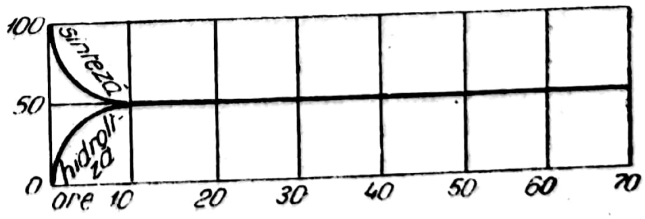


Fig. 66. Reversibilitatea reacţiei hidroliză-sinteză

Sensul în care se petrece o reacţie la un moment dat, însă,

este determinat de legea acțiunii masselor și de disponibilitatea de energie liberă.

In celulă se petrec continuu procese de hidroliză și de sinteză care se echilibrează între ele, dar nu în fiecare moment echilibrul este același : în unele momente va predomina un singur proces, de exemplu în acumularea materiilor de rezervă. Unii autori cred că ar exista chiar enzime diferite de sinteză și de degradare. In vitro, sintezele enzimatice se realizează infinit mai greu decât degradările enzimatice, deoarece necesită aport de energie. Ele se pot realiza numai în condiții cu totul speciale și prezintă un interes deosebit pentru cunoașterea însăși a sintezelor celulare.

Danilevschi în 1886 și 1888 a făcut prima sinteză fermentativă studiind acțiunea pepsinei asupra peptonei : el adaugă extract stomacal peptonei și obține un precipitat având o analogie de structură cu proteinele. *Sawyalor* (1901) numește produsele formate plasteine. Deci ar fi o sinteză enzimatică adevărată. *Blagovescenschi* (1937) reface aceste experiențe, modificând condițiile și le confirmă. 12 ani după Danilevschi, *Hill* realizează in vitro sinteza maltozei. In genere, sintezele enzimatice reușite in vitro fac parte din cadrul reacțiilor hidrolitice, reacții slab exoterme, care pentru a fi inversate, cer un aport mic de energie din afară, reacția de sinteză fiind endotermă. Bazați pe această constatare, *Blagovescenschi* și *Jurenson* (1937) cuplează reacțiile de sinteză endoterme cu sisteme donatoare de energie, de exemplu cuplează reacția de sinteză a proteinelor cu reacția de desfacere a H_2O_2 sub acțiunea peroxidazelor (reacție exotermă) ; prin aceasta se realizează condiții mai apropiate de acelea care se găsesc in interiorul celulei, unde există un complex de acțiuni enzimatice care lucrează cu mecanisme foarte diferite și pot astfel să colaboreze la acțiunea de sinteză. S'au realizat deasemenea sinteze enzimatice lucrând la presiuni mari, 5 000 de atmosfere. Din cauza greutăților de a realiza sinteza enzimatică, unii autori admit că ar exista enzime speciale de sinteză, care s'ar distruge atunci când se face extragerea lor din celule. Totuși, cazurile destul de frecvente de sinteză enzimatică in vitro fac să se creadă că una și aceeași enzimă realizează și degradarea și sinteza și că trebue numai condiții speciale pentru a realiza cu preponderență o reacție sau alta. Este așa numita *concepție unitară* asupra acțiunii enzimelor. Există în celule o multiplicitate de cauze care pot inhiba sau stimula una sau alta dintre reacții.

CARACTERELE SPECIALE ALE ENZIMELOR

In afară de proprietățile enzimelor, care decurg din analogia cu catalizatorii obișnuiți, enzimele mai au o serie de proprietăți specifice, care derivă din structura lor coloidală. Aceste proprietăți sunt următoarele :

1. au o foarte mare specificitate ;
2. au o mare sensibilitate față de variațiile de temperatură ;
3. au o mare sensibilitate față de variațiile de pH ;
4. sunt foarte sensibile față de electrolite în general.

Vom analiza ulterior fiecare din aceste proprietăți în parte.

Enzimele în soluție apoasă și în general în mediul lor de dispersie se găsesc sub formă coloidală, aceasta datorită greutății lor moleculare mari, care le conferă caracterul coloidal.

Scanned with OKEN Scanner

Greutatea moleculară a enzimelor a fost determinată prin diverse metode :

1. *metoda difuziunii* (se calculează greutatea moleculară din viteza de difuziune) ;
2. *metoda presiunii osmotice* ;
3. *metoda ultracentrifugării* (ultracentrifugele Svedberg cu o viteză de turaţie foarte mare, 40 000—60 000 turaţii pe minut).

Astfel, s'au găsit pentru enzimele obţinute sub formă cristalizată, deci foarte pure, valori de următorul ordin de mărime :

pentru	*pepsină*	o	greutate	moleculară	de	35 000
„	*catalază*	„	„	„	„	248 000
„	*ureză*	„	„	„	„	483 000
„	*tripsină*	„	„	„	„	34 000

Se vede că aceste valori sunt de ordinul de mărime 35 000 sau un multiplu. Nu se poate spune însă dacă avem de a face cu macromolecule sau cu micele.

Specificitatea enzimelor

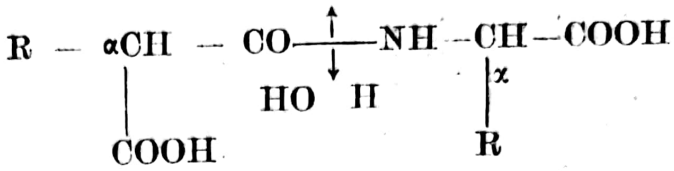
Enzimele diferă de ceilalţi catalizatori prin aceea că posedă o specificitate marcată. Se înţelege prin specificitatea unei enzime proprietatea acesteia de a lucra catalitic asupra unui singur substrat, sau cel mult asupra unei grupe de substanţe cu caractere chimice comune, şi de a cataliza anumite reacţii. Se poate deosebi o *specificitate absolută* sau o *specificitate strictă* şi o *specificitate relativă*. Când enzima lucrează asupra unui singur substrat şi catalizează o singură reacţie, specificitatea este strictă ; de exemplu, ureaza lucrează numai asupra ureei. Specificitatea relativă poate prezenta grade diverse de specificitate ; astfel, pepsina nu atacă decât proteinele, dar toate tipurile de proteine ; amilaza atacă polizaharidele, amidonul, dextrina şi glicogenul ; lipazele şi esterazele grăsimile şi esterii. Aceasta este o specificitate relativă sau de grup. Enzima lucrează asupra compuşilor cu caractere chimice comune, cu grupări funcţionale comune. Intensitatea catalitică nu este însă aceeaşi pentru diversele substrate. Există o specificitate legată nu numai de gruparea funcţională, ci şi de *poziţia* acestei grupări funcţionale în moleculă. De exemplu : polipeptidazele scindează toată gruparea polipeptidică —CO—NH—, catalizând reacţia cu fixarea componentelor apei la punctele de scindare :

$$-CO\overset{\uparrow}{\underset{\downarrow}{|}}NH\rightarrow -COOH + -NH_2$$
$$\quad\quad HOH$$

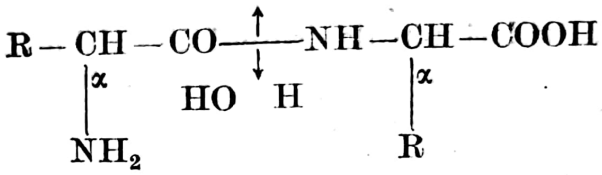
După gruparea funcţională fixată la carbonul α, scindarea va fi catalizată de anumite enzime, de anumite polipeptidaze. De exemplu, dacă la carbonul α este fixată o grupare aminică, reacţia va fi catalizată de o aminopolipeptidază :

$$R-\underset{\displaystyle NH_2}{\alpha CH}-CO\overset{\uparrow}{\underset{\downarrow}{|}}NH-\underset{\displaystyle R}{CH}-CO-NH_2$$
$$\quad\quad\quad\quad\quad\quad HOH$$

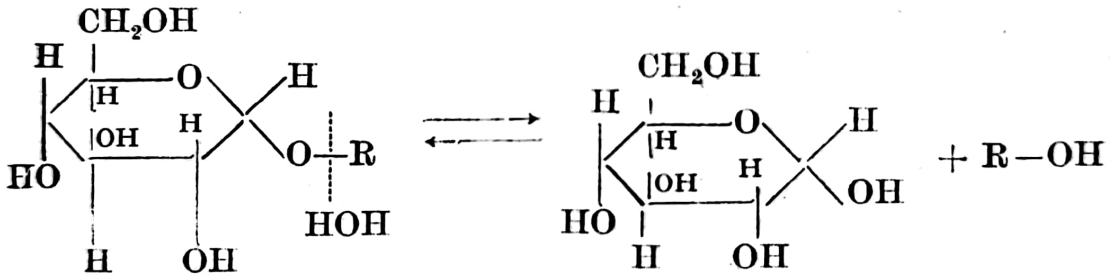
și de o carboxipolipeptidază, dacă la carbonul α e fixată o grupare carboxilică :



Polipeptidazele fac scindarea lanțului polipeptidic numai până la dipeptide. Acestea sunt scindate sub acțiunea catalitică a unor enzime speciale, dipeptidazele :



Specificitatea stereochimică este una din cele mai caracteristice și interesante specificități ale enzimelor. Un exemplu este maltaza care atacă *d*-α-glicozidele, dar nu și β-glicozidele.

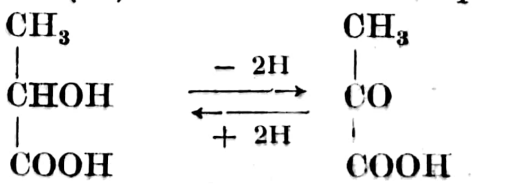


d-α-glicozid — α-glucoza

Această enzimă nu poate acționa decât dacă în moleculă există o legătură α-glicozidică.

Exemplul clasic (Pasteur) e însă acela al enzimelor din *Penicillium glaucum*, care se știe că atacă acidul *d*-tartric, dar nu și pe cel *l*-tartric. Zaharurile din natură sunt în genere sub forma izomerilor *d*, iar aminoacizii sub forma *l*.

Astfel, dehidrogenaza lactică din mușchi, catalizează dehidrogenarea formei *L* (+), dar nu *D* (−) acid lactic la acid piruvic :



acid lactic — acid piruvic

Specificitatea enzimelor este legată probabil de structura lor chimică.

Datorită sensibilității enzimelor la diverși factori, aceștia vor avea acțiune asupra activității lor.

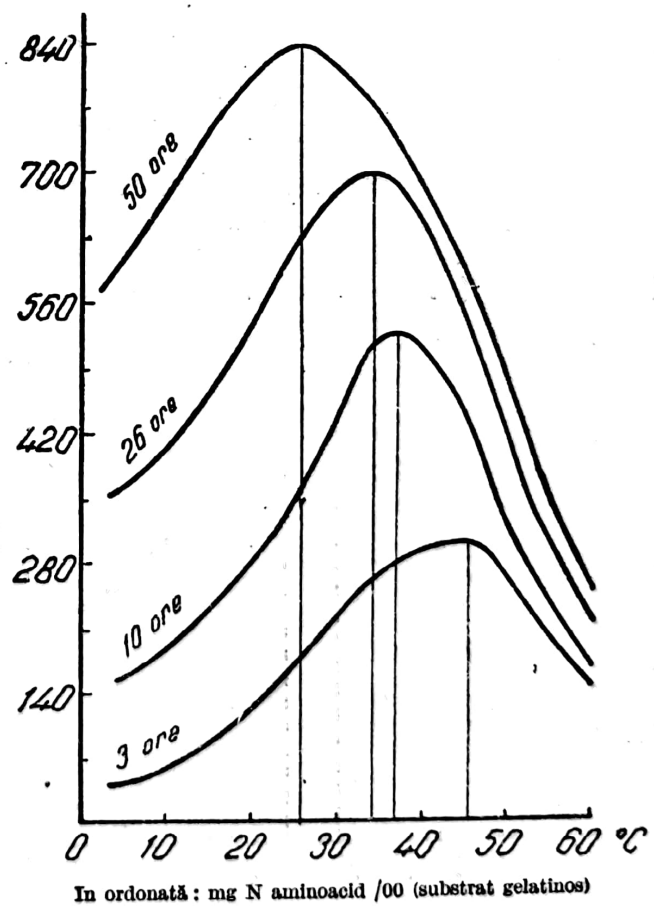
Determinarea activității enzimatice

Activitatea unei enzime este calculată după cantitatea componentelor chimice care rezultă din reacția de cataliză, în condiții determinate, deoarece această activitate este în funcție de o serie de factori pe care îi vom vedea în cele ce urmează.

Factorii care influențează activitatea enzimatică sunt:

1. temperatura;
2. pH-ul;
3. electrolitele;
4. concentrația substratului;
5. concentrația enzimei;
6. activatori și inhibitori.

1. **Sensibilitatea enzimelor la variațiile de temperatură.** Enzimele sunt termolabile: încălzite dincolo de o anumită temperatură își pierd în mod ireversibil activitatea lor enzimatică. In general, toate enzimele sunt inactivate printr'o încălzire peste 80°; multe din ele, chiar prin încălzire peste 55°; extrem de puține (ribonucleaza) rezistă la o încălzire de 3′ la 100°. Temperaturi coborîte nu distrug activitatea enzimatică, dimpotrivă, o conservă; acțiunea frigului realizează numai o oprire reversibilă a activității enzimatice. Fiecare enzimă are o temperatură de activitate optimă; până la atingerea acestei temperaturi optime, activitatea enzimatică sporește proporțional cu creșterea temperaturii, și anume, pentru fiecare 10°, activitatea crește de aproximativ două ori. Dincolo de temperatura optimă, această activitate scade progresiv datorită distrugerii enzimei și, la o anumită valoare limită, enzima e distrusă în mod ireversibil. Temperatura optimă poate varia încă cu durata de expunere a enzimei; astfel, pentru durate de timp scurte, temperatura optimă este mai mare decât pentru durate de timp mai lungi, această acțiune fiind legată pe de o parte de acțiunea temperaturii asupra enzimei însăși, pe de altă parte de acțiunea temperaturii asupra reacției pe care o catalizează enzima. Vezi figura 67 în care se pune în evidență influența temperaturii asupra unei proteinaze digestive (substrat gelatină). Acest fapt este important, deoarece reprezintă o adaptare a enzimelor la condițiile biologice în care trebue să se petreacă o reacție.



In ordonată: mg N aminoacid /00 (substrat gelatinos)

Fig. 67. Influența temperaturii asupra proteinazei digestive

Intr'adevăr pentru reacțiile chimice în general, coeficientul de temperatură Q_{10} este aproximativ 2, adică

creşterea vitezei de reacţie este dublă pentru fiecare ridicare de temperatură cu 10°; dacă se determină însă pentru enzime viteza inactivării termice la temperaturi în jurul a 70 — 80°, se găsesc pentru Q valori de ordinul sutelor. Or, coeficienţii de temperatură de acest ordin nu se întâlnesc decât la două tipuri de reacţii, şi anume: inactivarea termică a enzimelor şi denaturarea termică a proteinelor, ceeace denotă natura proteică a enzimelor. In stare uscată, enzimele sunt mult mai rezistente la variaţii de temperatură; deaceea, în genere, se conservă sub această formă. Inactivarea ireversibilă prin căldură se explică prin natura *coloidală* a enzimelor şi e comparabilă cu coagularea ireversibilă a proteinelor prin căldură.

2. **Sensibilitatea enzimelor faţă de pH.** Activitatea enzimelor e în funcţie de pH-ul mediului în care îşi exercită acţiunea lor. Pentru fiecare enzimă există o zonă de pH în interiorul căreia ea îşi poate exercita acţiunea sa catalitică. Această zonă e limitată de două valori ale pH-ului, numite pH-uri limită, dincolo şi dincoace de care enzima nu-şi poate exercita activitatea sa; în interiorul acestei zone există o valoare pentru care activitatea enzimei e maximă, aşa numitul *pH optim de activitate*. Curba activităţii enzimatice în funcţie de pH apare astfel ca o curbă iniţial ascendentă, apoi descendentă cu un maxim pentru pH-ul optim (fig. 68, 69). [Dacă se consideră maximul de activitate egal cu *1* se obţine pentru zaharază curba (fig. 68), pentru tripsină curba (fig. 69)[. pH-ul optim al diverselor enzime coincide în general cu pH-ul lichidelor din organism, unde îşi exercită acţiunea. De exemplu, pH-ul pepsinei este între 1,5—2,5, realizat tocmai în sucul gastric de HCl, al tripsinei este între 8—11, identic cu pH-ul sucului pancreatic (v. tabelul 9).

Acţiunea ionilor H^+ asupra activităţii enzimatice se explică prin acţiunea lor asupra stării de ionizare a moleculei; se presupune că enzimele au caracter amfolitic, pentru unele din ele fiind mai activă molecula întreagă, pentru altele unul din ionii componenţi ai acestei molecule.

Dăm mai jos un tabel cuprinzând pH-urile optime ale unor enzime importante (v. tabelul 9).

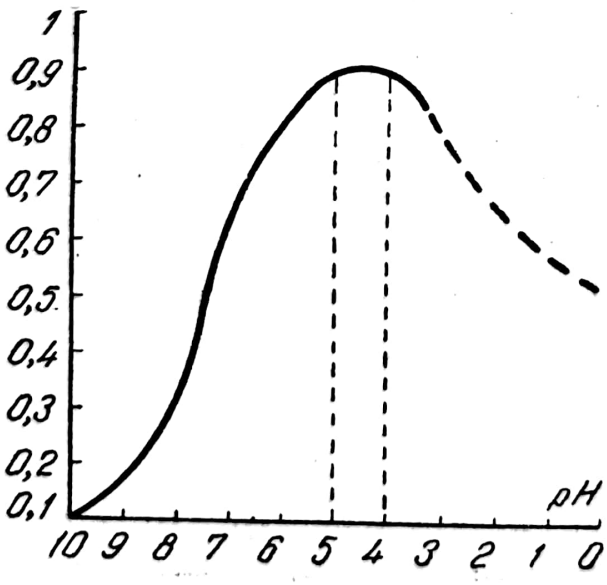


Fig. 68. Activitatea enzimatică a zaharazei în funcţie de pH

In cazul când enzimele lucrează asupra unui substrat el însuşi ionizabil în funcţie de pH, variaţiile acestuia vor influenţa condiţiile ionice, atât pentru enzimă, cât şi pentru substrat, astfel că pH-ul optim poate varia cu o serie de factori.

pH-ul optim de activitate al unei enzime are astfel o valoare fixă şi caracteristică, dar el poate suferi variaţii sub influenţa a numeroşi factori şi anume:

a) variază cu *temperatura*: de exemplu, amilaza din malţ la 40° are pH-ul optim 4,4; la 60°, pH-ul optim de 6;

b) variază cu *diverşii ioni* din soluţie; de exemplu, în tampon

Scanned with OKEN Scanner

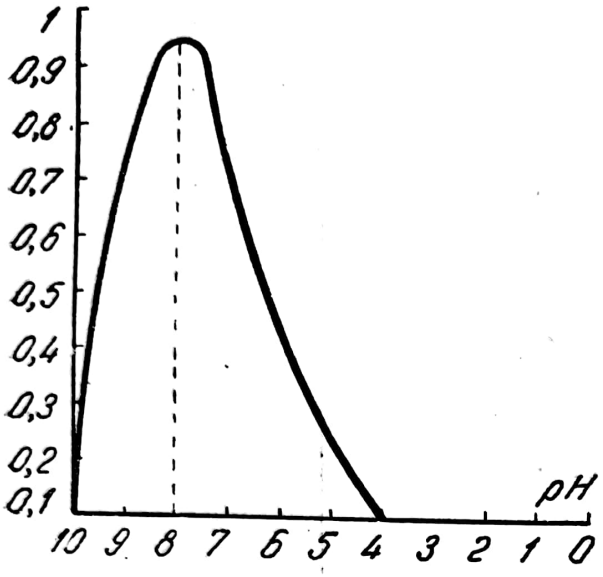


Fig. 69. Activitatea enzimatică a tripsinei în funcție de pH

acetat de sodiu, amilaza pancreatică are pH-ul optim 5,5; în tampon fosfat 7,5. Amilaza salivară în tampon fosfat are pH-ul optim 6,7, în mediu de cloruri 6 (fig. 70);

c) variază cu *substratul*; de exemplu, enzimele proteolitice au un pH optim care variază în anumite limite în funcție de proteina-substrat. Maltaza din drojdie are pH-ul optim 6,6 pentru substratul maltază și pH = 6,2 pentru -metilglicozid.

Variază și cu concentrația substratului de exemplu, ureaza are pH 6,9 pentru concentrația 2,5% și pH = 7,6 pentru concentrația 0,1% substrat;

d) variază cu *origina enzimei*. De exemplu, amilaza din malț are optimul la pH 5,2, aceea din pancreas la aproximativ 7, aceea din ficat la pH = 6,0.

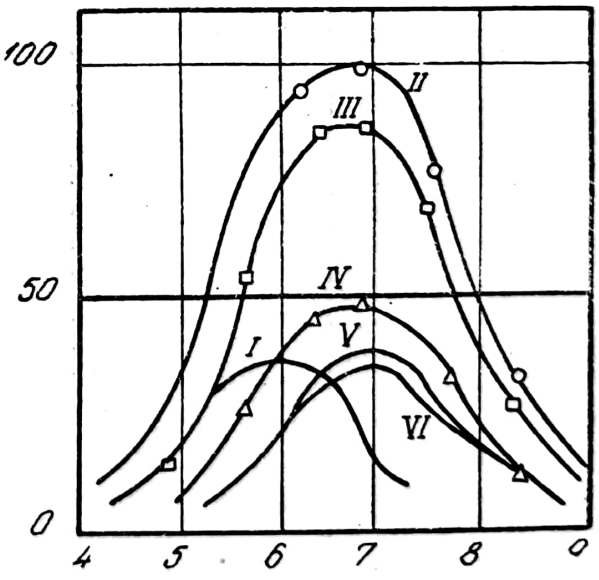
3. **Acțiunea electrolitelor asupra activității enzimatice.** Diverșii ioni pot avea o acțiune de stimulare sau de inhibare a activității enzimatice. De exemplu, amilaza e activă numai în prezența NaCl, respectiv a ionului Cl; fosfatazele sunt activate de ionii Mg^{++}; lipaza, de ionii Ca^{++}; arginaza de ionii Co^{++},Mg^{++}, Ni^{++}. Ionii metalelor grele Ag, Hg inhibă acțiunea catalitică a enzimelor. Inhibitori electrolitici puternici sunt fluorurile, cianurile, sulfurile, citrații, etc.

4. **Influența concentrației substratului asupra acțiunii enzimatice.** Pentru aceeași concentrație de enzimă activitatea crește cu concentrația substratului până la o anumită valoare. De exemplu, activitatea zaharazei e în funcție de concentrația zaharozei indicată în fig. 71, 72.

5. **Influența concentrației enzimei asupra activității enzimatice.** In general, activitatea enzimatică e direct proporțională cu concentrația enzimei (fig. 73).

6. **Activatorii și inhibitorii enzimelor** pot modifica activitatea enzimatică.

Activatorii enzimelor. Activarea substratului este indispensabilă pentru cataliza enzimatică. S'a constatat însă că, în marea



In ordonată: viteza inițială de hidroliză
In abscisă: pH-ul.
Curba I: urme de NaCl *Curba II*: NaCl *Curba III*: Na Br
Curba IV: KI *Curba V*: NO_3 Na *Curba VI*: ClO_3K

Fig. 70. Influența anionilor asupra activității amilazei salivare.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 9

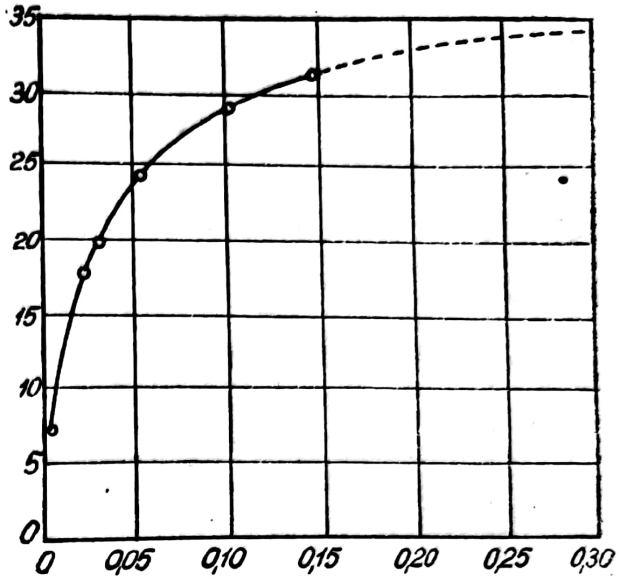
pH-ul optim de activitate al diverselor enzime

Enzima	Origina enzimei	Substratul	pH-ul optim
Pepsina	Stomac	Proteine diverse	1,5—2,5
Catepsina	Splină	Serumalbumine	3—4
Tripsina	Pancreas	Proteine diverse	8—11
Arginaza	Ficat	Arginină	9,5—9,9
Lipaza	Pancreas	Etilbutirat	7—8,5
Lipaza	Ficat	,,	7
Maltaza	Intestin	Maltoză	5,6
Zaharaza	Intestin	Zaharoză	6,2
Amilaza	Salivă	Amidon	6,7—7,2
,,	Pancreas	,,	6,0—6,1
,,	Intestin	,,	~ 7
,,	Ficat	,,	~ 6
,,	Mușchi	Glicogen	~ 7
,,	Malț	Amidon	4,4—4,5
Fosfataza *a*) alcalină *b*) acidă	 Sânge Sânge	 β-Glicerofosfat β-Glicerofosfat	 8,8—9,5 4,5—5,2
Catalaza	Ficat	Apă oxigenată	6,8
Ureaza	Soya	Uree	7,0
Succindehidrogenaza	Mușchi	Succinat	9,0
Carboxilaza	Drojdie de bere	Piruvat	4,8
d-Aminoacid-oxidaze	Ficat, rinichi	D. L. Alanina	9,0

Scanned with OKEN Scanner

majoritate a cazurilor, pentru acțiunea enzimatică este necesară prezența altor componente deçât substratul și enzima, componente care să activeze enzima.

Există o serie de ioni și de alte componente tisulare care au capacitatea de a activa și uneori chiar a iniția acțiunea de cataliză specifică a enzimelor. De exemplu: sărurile biliare, sărurile de calciu și albuminele activează și chiar fac posibilă acțiunea lipazei; glutationul activează amilaza pancreatică. Am văzut că o serie întreagă de ioni sunt indispensabili acțiunii catalitice; de exemplu, arginaza e activă numai în prezența ionilor bivalenți: Co^{++}, Mn^{++}, Ni^{++} amilaza pancreatică și salivară au nevoie de ioni Cl; papaina e activată de ionii CNH; fosfatazele necesită prezența Mg^{++} pentru activarea lor.



In ordonată: viteza inițială de hidroliză
In abscisă: concentrația moleculară a zaharazei.

Fig. 71. Influența concentrației substratului asupra activității zaharazei

Acțiunea acestor activatori poate fi datorită sau unei acțiuni de stimulare propriu zisă sau unei acțiuni de îndepărtare a unui inhibitor din sistem; de exemplu, ureaza e activată uneori de prezența proteinelor, al căror rol este de a îndepărta urmele de metale grele din sistem, metale care au o acțiune de inhibare a enzimei. Acești activatori au deci rol protector și numai indirect rol activator. Se pot distinge trei tipuri principale de activatori: activatori care acționează prin deblocarea grupărilor reactive din molecula enzimei (acesta este cazul kinazelor după cum vom vedea mai departe), activatori care înlătură din sistem un inhibitor al enzimei și activatori care pot fi înșeși componente ale enzimei, ca de exemplu diverși ioni.

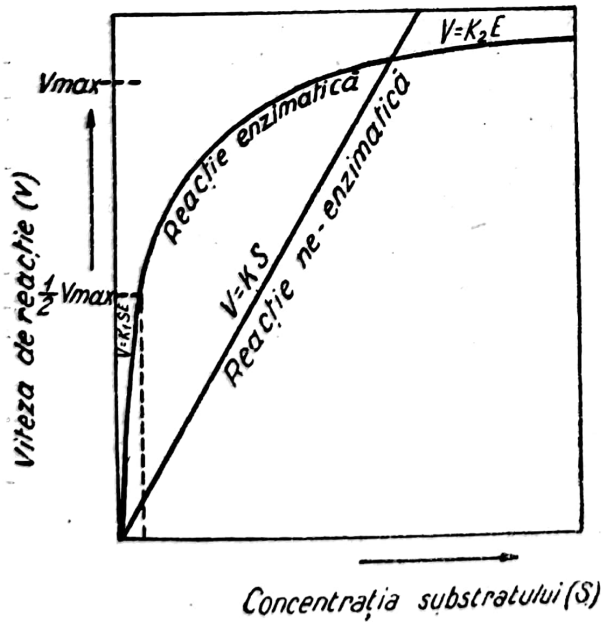
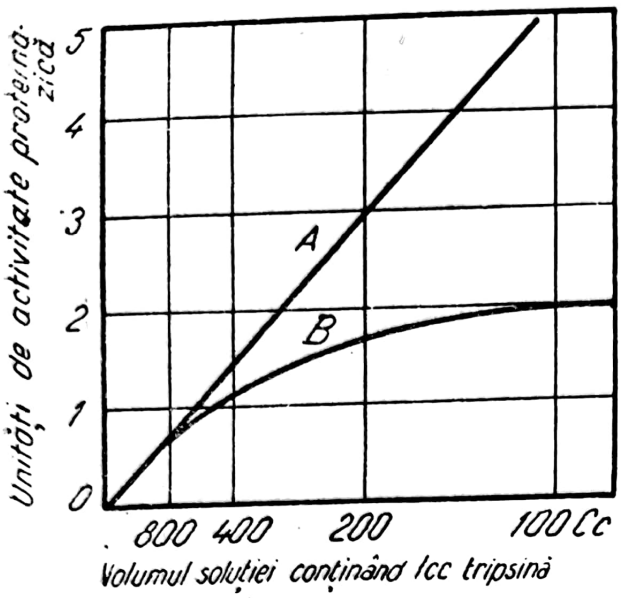


Fig. 72. Efectul concentrației substratului asupra vitezei de reacție (reacție enzimatică și neenzimatică).

Inhibitorii enzimelor scad activitatea lor catalitică. Ionii metalelor grele Ag, Hg, Cu, au acțiune inhibitorie intensă: astfel, 1 g atom de Ag inactivează 70 000 g urează cristalizată. Dacă ureaza are greutatea moleculară 483 000, înseamnă că 7 atomi de Ag se unesc cu fiecare moleculă de urează. Inhibarea poate fi reversibilă și ireversibilă. Fluorul inhibă enzimele

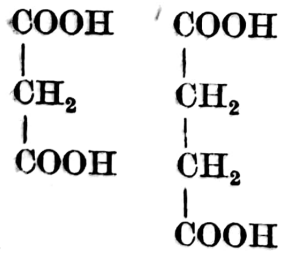


Curba A: soluție pură de tripsină
Curba B: tripsină impurificată

Fig. 73. Influența concentrației enzimei asupra vitezei de hidroliză

care necesită Mg pentru activitatea lor. Ionul — CN —SH inhibă peroxidazele și catalaza. In general, orice substanță capabilă de a reacționa cu gruparea sulfhidrică este un inhibitor al enzimelor. Razele ultraviolete și infraroșii pot inhiba enzimele.

Inhibarea competitivă a enzimelor este foarte interesantă, deoarece există tendința de a explica acțiunea bacteriostatică a sulfamidelor și în genere a antibioticelor printr'un mecanism de acest tip. Intre anumite substanțe cu acțiune inhibitorie asupra unei enzime date și substratul asupra cărora lucrează această enzimă în chip obișnuit există uneori o analogie de structură atât de mare încât se poate admite, și pentru sulfamide s'a demonstrat acest lucru, că ar exista o competiție între ele; astfel, acidul p-aminobenzoic și vitamina H' de creștere (din organismul bacteriilor), având analogie de structură cu sulfonamidele, acestea se pot substitui substratului real din organismul bacteriei și astfel inhibă acțiunea enzimatică (pentrucă, deși se pot uni cu acestea, din cauza analogiei de structură, totuși nu pot fi atacate de enzimă, neexistând identitate de structură). Tot astfel, histidaza care degradează *l*-histidina e inhibată de *d*-histidina, aminoacidul nenatural, care poate bloca enzima, unindu-se cu ea grație analogiei de structură, dar nu poate fi catalizată de aceasta, deoarece nu există identitate de structură cu *l*-histidina naturală. Ezerina inhibă hidroliza acetilcolinei sub acțiunea catalitică a colinesterazei printr'o inhibare competitivă datorită probabil unei analogii de structură cu acetilcolina. Tot astfel, malonatul inhibă succindehidraza. Acidul malonic este un diacid cu structura analoagă acidului succinic:



Malonatul se unește cu această enzimă, ca și substratul său specific succinatul, dar complexul succinat-enzimă se scindează dând produsul de reacție și enzima liberă, pe când produsul malonat-enzimă nu va modifica viteza de reacție prin scindarea enzimei. O parte din enzimă rămâne deci blocată sub formă de complex enzimă-inhibitor și nu mai poate fi folosită în reacția de oxidare a succinatului.

Se cunosc și alte inhibări competitive, ca de exemplu complecta inhibare a zaharazei de către fructoză, a xantinoxidazei de către adenină.

Existența inhibării competitive pledează pentru ipoteza că între enzimă și substrat există o unire, și aceasta destul de specifică. Combinarea substratului cu enzima am văzut că este prima etapă și cea fundamentală

în procesul de cataliză, unire care duce la o activare a substratului; dar, în afară de această activare, substratul mai poate fi activat de prezența anumitor componente în sistem. Exemplul cel mai interesant este acela al hemoglobinei: hemul nu se poate uni cu oxigenul în mod reversibil și fără a-și modifica valența fierului din moleculă decât când este combinat cu globina. In absența globinei, hemul se oxidează spontan, Fe^{++} se transformă în Fe^{+++} (compusul hematină). Deci, prezența unei anumite componente, în acest caz globina, activează hemul, făcându-l să reacționeze într'un anumit sens. Globina, prin combinare cu hemul, îi conferă acestuia o mai mare solubilitate în apă și proprietatea de a reacționa reversibil cu oxigenul fără ca valența să se modifice.

I n h i b i t o r i i n a t u r a l i. S'au putut izola în câteva cazuri din țesuturi substanțe inhibitorii ale enzimelor. Astfel, Wieland (1903) arată că extracte ale parazitului intestinal *Ascaris* au acțiune antitriptică și antipeptică. Existenței acestor inhibitori i se atribue faptul că acest vierme intestinal nu e digerat în intestin de enzimele proteolitice aflate aici. Albușul de ou conține un inhibitor al tripsinei.

Antienzimele sunt anticorpi inhibitori ai enzimelor. S'a reușit să se producă în organismul animalelor inhibitori ai enzimelor în urma inoculării acestor organisme cu enzimele respective. Astfel, inoculând parenteral tripsină, pepsină, urează, hialuronidază, desoxiribonuclează, se obțin seruri specifice care inhibă acțiunea acestor enzime în mod specific. In acest sens au analogie cu antitoxinele și anticorpii produși în organismul animal în urma injecțiilor de antigen sau antigene microbiene. Enzimele pot funcționa deci ca antigene, proprietate care este legată de structura lor proteinică. Antienzimele sunt specifice enzimelor individuale și este posibil ca ele să joace un rol în protejarea tubului digestiv față de enzimele proteolitice, în protejarea viermilor intestinali, etc.

Z i m o g e n e ș i k i n a z e. Zimogenele sunt forma inactivă a enzimelor. Zimogenele se transformă în enzime active sub acțiunea *kinazelor*.

Foarte adesea în organism, la locul lor de formare, enzimele există sub forma inactivă de zimogene, sub formă de proenzime, care deabia sub acțiunea kinazelor, ce se formează în organism în anumite locuri sunt transformate în enzime active. De exemplu, tripsinogenul e zimogenul tripsinei: e format în pancreas și prezent în sucul pancreatic; ajungând în intestinul subțire întâlnește enterokinaza și se transformă în tripsină activă. Pepsina se găsește deasemenea sub formă de zimogen; sub acțiunea HCl se transformă în pepsină activă. Prorenina e zimogenul reninei, etc. Vom vedea mai în detaliu aceste lucruri la capitolele respective. Se crede că transformarea dela zimogen la enzimă sub acțiunea kinazelor ar fi datorită înlăturării unui inhibitor din sistem, de către acestea din urmă.

Din datele expuse de noi asupra diverșilor factori care pot influența activitatea enzimelor se pot scoate anumite concluzii în legătură cu factorii de reglare a activității enzimatice în însăși celula vie, unde enzimele constitue tocmai factorii principali de reglare a activității metabolice. Apare astfel posibil ca prin modificări ale activității enzimelor să se poată modifica întregul metabolism al celulei, respectiv al unui organ. Modificări de pH, modificări ale substratului, ale concentrării enzimei, ale potențialelor de oxidoreducere, ale diverșilor ioni, și chiar modificări în structura substratului celular pot duce la variații enzimatice importante. Școala

Scanned with OKEN Scanner

sovietică, în frunte cu Oparin (1933) a încercat să explice activitatea şi inactivitatea enzimelor în celule, plecând dela concepţia că această activitate e reglată de variaţii ale structurilor celulare, de natură coloidală, care la rândul lor sunt în funcţie de diverşi factori enumeraţi mai sus. Mediul celular fiind heterogen face ca repartiţia enzimei şi a substratului respectiv să fie inegală. Una din problemele nelămurite în studiul enzimelor celulare era următoarea : în celulă, substratul coexistă cu enzima respectivă şi totuşi nu are loc în mod permanent o acţiune enzimatică. De exemplu, amilaza coexistă în frunze cu grăunţele de amidon şi totuşi nu-l atacă decât în anumite condiţii. S'a dovedit că invertaza există în sfeclă în timpul iernii şi totuşi nu atacă zahărul, deci trebue să existe condiţii care să împiedice această acţiune, trebue să existe o separaţie spaţială între cele două componente. *Oparin* explică acest lucru în felul următor : enzima e adsorbită în celule pe diverse suprafeţe heterogene : mitocondrii, plastide, cromomere, etc. In această adsorbţie îşi pierde temporar activitatea enzimatică, pe care şi-o reface când reintră în soluţie. Deci, prin adsorbţie, enzima este inactivată, prin eluţie îşi recapătă activitatea. Inactivarea şi activarea enzimei sunt deci în funcţie de adsorbţia acesteia pe anumite structuri.

O experienţă foarte interesantă este aceea a lui Oparin, Mascaia şi Magrani. Dacă purifică prin dializă o soluţie de albumină, aceasta rămâne în soluţie după o încălzire de trei minute pe baie de apă la 100°, deoarece nu conţine electrolite. Dacă în acest sistem se lasă să lucreze amilaza din malţ, ea îşi păstrează activitatea ; dacă se adaugă însă o picătură de $CaCl_2$ se face o precipitare a albuminei şi concomitent are loc o inactivare a enzimii care a fost adsorbită pe suprafeţele de separaţie create prin precipitarea albuminelor. Chrzaaszcs admite că alături de o adsorbţie şi eluţie mai intervin în inactivarea şi activarea unei enzime şi alţi factori capabili să realizeze crearea de suprafeţe heterogene în celule ; respectiv, precipitarea şi solubilizarea compuşilor celulari, substanţe numite de aceşti autori sisto-substanţe şi eluto-substanţe. Heterogeneitatea protoplasmei e un factor important pentru reglarea acţiunilor enzimatice, cu condiţia ca să se creeze prin adsorbţie şi eluţii, separaţii şi, respectiv, apropieri spaţiale între enzimă şi substrat.

STRUCTURA ENZIMELOR

In stadiul actual al cunoştinţelor noastre s'a ajuns la următoarele concluzii asupra structurii enzimelor.

Enzimele au *caracter coloidal, proteinic,* molecula lor având o structură dualistă.

După *Willstätter,* molecula enzimei e formată din două componente, şi anume : un *suport coloidal* şi o grupare pur *chimică, activă.* Acesta este complexul *„simplex"*. Fiecare din aceste componente, separate, este enzimatic inactivă ; împreună determină specificitatea şi activitatea enzimei. Gruparea activă e fixată pe suport coloidal, de unde şi numele de teorie a „suportului" sau „Trägertheorie" (Willstätter).

Câteva date experimentale găsite anterior formulării acestei teorii o îndreptăţesc. *Gabriel Bertrand* (1894) a separat dintr'o enzimă de oxido-reducere, laccaza (o oxidază), extrasă din sucul arborelui de lac, două componente : una coloidală, alterabilă, şi o alta numită de el „comple-

Scanned with OKEN Scanner

mentara activă", aceasta din urmă găsită a fi manganul. Mai târziu, Harden şi Young (1904—1907) separă prin ultrafiltrare şi dializă din sucul enzimatic al drojdiei de bere o enzimă, zimaza, care deasemenea conţine două componente: una nedializabilă, termolabilă, cu caracter coloidal şi pe care o numesc „apozimaza", şi o componentă dializabilă, termostabilă, pe care o numesc cozimaza. Fiecare din aceste componente, separate, sunt inactive; reunite, restabilesc activitatea enzimatică. Ulterior s'a reuşit separarea şi din alte enzime a două componente distincte, condiţionând împreună specificitatea şi activitatea enzimei. *Von Euler* lărgeşte această denumire la toate enzimele, dând numele de *apoenzimă* componentei coloidale şi de *coenzimă*, componentei active, iar întregului complex, denumirea de *holoenzimă*. Aşa dar:

Holoenzima = apoenzima + coenzima.

Combinaţii cu structură dualistă, formate dintr'o componentă proteinică şi o componentă prostetică activă sunt foarte răspândite în natură, chiar în afara grupei enzimelor, de exemplu hemoglobinele, deaceea Kraut şi *Pantschenko-Yurevicz* propun denumirea de *„agon"* pentru gruparea activă, *„pheron"* pentru gruparea proteinică, iar pentru întregul complex denumirea de *simplex*; numirea de „agon" se suprapune astfel denumirii de „apoenzimă", cea de „pheron" denumirii de coenzimă, iar cea de „simplex", denumirii de holoenzimă. Concepţia dualistă asupra structurii enzimelor a fost verificată pentru multe enzime, dar nu pentru absolut toate. S'au reuşit izolarea şi identificarea chimică a coenzimei unor „redoxaze" (dehidraze, flavine, carboxilaze, peroxidaze, catalază). Pentru o serie de alte enzime, în special dintre acelea obţinute sub formă cristalizată (pepsina, tripsina, ureaza), nu s'a reuşit desfacerea în două componente (apo- şi coenzima), ceeace a făcut pe unii autori să le considere că având structură unitară, şi anume de proteine pure, deoarece nu au reuşit să izoleze alte grupări active, iar hidroliza lor elibera numai aminoacizi, spre deosebire de enzimele cu structură dualistă care ar fi heteroproteine. Totuşi, pentru încadrarea acelor enzime în concepţia dualistă a lui Willstätter, se poate admite că pentru acestea coenzima este un *ion* oarecare, deoarece prezenţa acestuia este indispensabilă activităţii enzimatice. De exemplu, pentru pepsină ar fi ionul Cl^-, pentru tripsină, ionul Na^+. Posibilitatea de a desface holoenzima în două componente este, desigur în funcţie de intensitatea legăturilor dintre acestea. Legătura dintre apo- şi coenzimă poate fi mai strânsă sau mai labilă; de exemplu, în cazul zimazei din drojdia de bere, o simplă dializă separă apoenzima de coenzimă; la flavine, carboxilaze, deasemenea; la enzimele heminice, desfacerea era mai grea, iar la enzimele cristalizate (pepsina, ureaza, tripsina), desfacerea nu s'a reuşit până acum. Se pot deci distinge coenzime fixate foarte stabil la componenta proteinică şi coenzime fixate mai labil.

Structura chimică a apoenzimei diverselor enzime este încă necunoscută în toate detaliile ei. Aceea a *coenzimelor* unora din enzime este însă bine cunoscută. Vom vedea la capitolul respectiv detaliile acestei structuri şi mecanismul lor chimic de acţiune.

Rolul celor două componente din molecula enzimei, al holoenzimei, este următorul:

apoenzima stabileşte legătura enzimei cu substratul corespunzător şi conferă acesteia specificitatea sa în raport cu acest substrat;

Scanned with OKEN Scanner

coenzima determină activitatea catalitică propriu zisă a enzimei şi în acelaş timp determină şi mecanismul acestei activităţi.

Rolul apoenzimei, în condiţionarea caracterului de specificitate al enzimei, se poate exemplifica în mod evident prin studiul comparativ al esterazei hepatice şi pancreatice. Esterazele, se ştie, catalizează reacţiile de hidroliză ale esterilor acizilor graşi. Esteraza hepatică scindează în special esterii acizilor graşi cu greutate moleculară mică, esteraza pancreatică hidrolizează esterii cu greutate moleculară mare. Mecanismul de esterificare este însă acelaş.

Dacă se combină coenzima pancreatică cu apoenzima hepatică, se obţine o holoenzimă cu caracterul esterazei hepatice; invers, dacă se combină coenzima hepatică cu apoenzima pancreatică se obţine o holoenzimă având caracterul esterazei pancreatice. Rezultă de aici că ambele enzime au un mecanism de acţiune comun, deci au aceeaşi coenzimă răspunzătoare de acţiunea de esterificare, dar au apoenzime diferite, deoarece au afinităţi diferite pentru un substrat anumit. *Apoenzima determină deci caracterul de specificitate al enzimei.* Apoenzima stabileşte prin grupările sale chimice speciale legătura cu substratul, iar coenzima orientează sensul reacţiei de transformare pe care o suferă substratul, combinat în prealabil cu apoenzima.

CLASIFICAREA ENZIMELOR

Clasificarea enzimelor se face luând în considerare *reacţia chimică pe care o catalizează şi substratul asupra căruia lucrează* (*Oppenheimer*). Conform acestui criteriu, enzimele se împart în două grupe mari: 1) *hidrolazele* şi 2) *desmolazele sau redoxazele.* In aceste două grupe mari se găsesc o serie întreagă de subgrupe pe care le vom descrie în cele ce urmează.

I. *Hidrolazele* sunt enzimele care catalizează reacţiile de scindare a moleculei unui substrat aflat în soluţie apoasă, cu fixarea concomitentă a componentelor apei la produsele de scindare. *Hidrolazele catalizează deci reacţiile de hidroliză.* Reacţiile acestea necesită în general transformări mici de energie.

II. *Desmolazele sau redoxazele* sunt *enzimele care catalizează scindarea lanţului carbonic al moleculelor printr'un mecanism de oxidoreducere.* Ele lucrează în general asupra moleculelor rezultate dintr'o prealabilă desfacere hidrolitică şi acţiunea lor poate duce la produsele finite ale degradării CO_2, H_2O.

Acţiunea desmolazelor este legată deci de transformări mai profunde, de transformări mari de energie, deaceea se mai numesc şi *enzime ale metabolismului energetic celular.* Fiecare din aceste grupe mari se împarte în subgrupe, în raport cu substratul şi cu gruparea funcţională asupra cărora acţionează enzima.

Dăm în cele ce urmează această clasificare.

I. Hidrolazele

Enzimele care catalizează reacţiile de hidroliză se împart în două *subgrupe* mari, care la rândul lor, se împart într'o serie de *sub-subgrupe*:

A. *Enzime care catalizează desfacerea legăturii — C — O.*

B. *Enzime care catalizează desfacerea legăturii — C — N —*

Scanned with OKEN Scanner

A. Enzimele care catalizează desfacerea hidrolitică a legăturii —C—O—

se împart în :

1. **Esteraze** care catalizează hidroliza esterilor şi pot fi :
   a) *lipaze* (scindează esterii acizilor graşi) ;
   b) *fosfataze* (scindează esterii acidului fosforic) ;
   c) *pirofosfataze* (scindează esterii acidului pirofosforic) ;
   d) *sulfataze* (scindează esterii acidului sulfuric) ;
   e) *colinesteraze* (scindează esterii colinei).
2. **Carbohidraze** care catalizează hidroliza zaharurilor. Cuprind subgrupele :
   a) *hexozidaze,* care desfac hidrolitic glicozidele şi dizaharidele. Acestea sunt :
      α) maltaza,
      β) lactaza,
      γ) emulsine,
      δ) zaharaza ;
   b) *poliaze,* care hidrolizează polizaharidele. Acestea sunt :
      α) amilaza,
      β) celulaza,
      γ) pectinaza ;
   c) *tanaza,* enzima care hidrolizează galotaninurile ;
3. **Nucleazele** scindează acizii nucleici şi derivaţii lor ; se împart în :
   a) *polinucleotidaze,* care scindează acizii nucleici în nucleotide,
   b) *nucleotidaze,* care scindează nucleotidele în nucleozide şi acid fosforic,
   c) *nucleozidaze,* care scindează nucleozidele în glucide şi baze azotate.

B. Enzimele care catalizează scindarea hidrolitică a legăturii —C—N—

se împart în :

1. **Amidaze,** care hidrolizează legătura amidică ; cuprind următoarele subgrupe :
   a) *ureaza,* scindează ureea în amoniac şi CO_2 ;
   b) *arginaza,* scindează arginina în ornitină şi uree ;
   c) *asparaginaza,* scindează asparagina în acid asparagic şi amoniac ;
   d) *hipuraza,* scindează acidul hipuric în acid benzoic şi glicocol ;
   e) *glutaminaza,* scindează glutamina în acid glutamic şi amoniac ;
   f) *transaminaza,* transformă acidul glutamic sau acidul aspartic în cetoacizii corespunzători ;
   g) *purindesamidazele,* scindează amoniacul din aminopurine transformându-le în oxipurine.
      α) adenaza, transformă adenina în hipoxantină şi amoniac.
      β) guanaza transformă guanina în xantină şi amoniac.
2. **Proteazele sunt enzimele de hidroliză a proteinelor cu subgrupele :**
   a) *peptidazele* desfac legătura peptidică din peptide. Se deosebesc grupele :
      α) polipeptidazelor,
      β) dipeptidazelor.

Acestea pot fi la rândul lor : $C—CO—NH_2$

— aminopolipeptidaze, care scindează hidrolitic gruparea peptidică alăturată unei grupări aminice libere : NH_2

— carboxipolipeptidaze, care scindează hidrolitic grupările peptidice alăturate unei grupări carboxilice,
— protaminaze, desfac argilina din protamine,
— prolinaze şi prolidaze, desfac prolina din peptine;

b) *proteinazele* sunt enzimele care scindează hidrolitic proteinele native; sunt fermenţii adevăraţi ai scindării proteinelor. Se deosebesc:

α) pepsina (pepsinaza) scindează proteinele în proteoze şi peptone,
β) tripsina (tripsinaza) scindează proteinele, în polipeptide şi aminoacizi,
γ) papaina (papainaza,) o pepsină vegetală,
δ) catepsina, proteinază tisulară care scindează proteinele în proteoze şi peptone;
ε) rennina transformă cazeina în paracazeină.

In nomenclatura mai nouă, proteinazele au şi denumirea de endopeptidaze, iar carboxi-, amino- şi dipeptidazele denumirea de exopeptidaze.

C. Fosforilazele

Sunt analoage hidrolazelor, dar scindează moleculele nu cu fixarea elementelor apei la moleculele scindate, ci ale acidului fosforic, conform reacţiei:

$$-R-R'+HO-PO_3H_2 \rightleftarrows R-O-PO_3H_2+R'H$$

Acestea intervin în hidroliza glicogenului în ţesutul muscular.

II. Desmolazele sau redoxazele

Prin *desmoliză* se înţeleg în biochimie procesele de degradare mai profundă care se realizează cu degajare de energie. Acţiunea desmolazelor se exercită asupra produselor rezultate după hidroliza substratului de către hidrolaze.

Desmolazele cuprind toate enzimele care scindează legăturile dintre doi carboni ai lanţului carbonic din moleculă şi acţiunea lor este în genere legată de o acţiune de oxidoreducere, de unde denumirea şi de redoxaze. Alături de acestea există şi o serie de enzime care se pot clasifica sub numele de enzime ajutătoare ale desmolizei.

După acţiunea lor, desmolazele se împart în mai multe grupe şi anume:

A. Dehidrazele (*sau dehidrogenaze*).

Sunt *enzimele care activează hidrogenul de pe substrat*, făcându-l *mobil*. Sunt enzime transportori de hidrogen; după substratul asupra căruia acţionează, există aldodehidraze, cetodehidraze, acidodehidraze, etc., unele din ele strict specifice pentru un anume compus (de exemplu: succinodehidraze, malicodehidraze, alcooldehidrogenaze, etc.).

B. Flavinenzimele

Sunt o serie de enzime de culoare galbenă. Fac parte din această grupă: α) fermentul galben respirator al lui Warburg; β) diaforaza; γ) citocrom-C-reductaza.

Scanned with OKEN Scanner

C. **Oxidazele**

Sunt enzimele care au proprietatea de a cataliza transportul hidrogenului „direct" pe molecula de oxigen ca acceptor. Hidrogenul însă nu-l pot lua direct de pe substrat, ci prin intermediul dehidrazelor.

Oxidazele se împart în mai multe grupe:

1. **Fier-enzime**, oxidaze care cuprind fier în moleculă.

Heminproteidele. Aparţin acestei grupe:

α) fermentul roşu respirator al lui Warburg
β) citocromii (*a. b. c.*),
γ) peroxidaza,
δ) catalaza.

2. **Cupru-enzime** sunt oxidaze care conţin Cu în moleculă. Aparţin acestei grupe:

a) *fenoloxidaza,*
b) *ascorbicoxidaza.*

III. **Enzime ajutătoare ale desmolizei**

1. **mutazele**, enzime care catalizează dismutaţia aldehidelor (sunt răspunzătoare de reacţia Cannizzaro aldehidmutaza, glioxalaza);
2. **liazele** fac scindarea moleculelor fără hidroliză şi fără oxidoreducere;
3. **hidratazele** fixează componentele apei la legăturile duble fără scindare de moleculă. De exemplu: fumaraza, aconitaza, enolaza;
4. **carboxilazele** catalizează decarboxilarea acizilor cetonici, a acizilor aminaţi;
5. **izomerazele**, enzimele care catalizează transformările sterice;
6. **ferazele**, enzimele care fac transportul de grupări în moleculă:
7. **carbonicanhidraza**, conţine zinc în moleculă. Scindează acidul carbonic în CO_2 şi H_2O. Se găseşte în eritrocite.

O altă clasificare a enzimelor poate fi următoarea:

Tabelul 10

I. *Enzime de scindare*

1. Hidrolaze

Reacţia generală: $R|R' + H|OH \rightleftarrows ROH + HR'$

Clasa şi tipul	Reacţia	Exemple
Peptidaze . . .	$-CO|HN- + H|OH \rightleftarrows -COOH + H_2N-$	Pepsina, tripsina, chimotripsina
Endopeptidaze .	. . . . .	Catepsina I şi II
Exopeptidaze .	. . . . .	Carboxi- şi aminopeptidaze, dipeptidaze, catepsină III şi IV
Carbohidraze . .	$\begin{matrix}-O\\-O\end{matrix}\!\!>\!CH|OC\!<\!\!\begin{matrix}\\\\\end{matrix} + H|OH \rightleftarrows \begin{matrix}-O\\-O\end{matrix}\!\!>\!CHOH + HO\cdot C\!<$	
Polizaharaze . .	. . . . .	α şi β amilaze, celulaza

Scanned with OKEN Scanner

(urmare tabelul 10)

Clasa și tipul	Reacția	Exemple
Glicozidaze	. . . . .	Maltaza, α și β glicozidaza, gluco- și fructo-zaharază
Esteraze	$-COO-C\lessgtr + HOH \rightleftarrows -COOH + HO\cdot C\lessgtr$	
Lipaze	. . . . .	Lipaza pancreatică, hepatică, colinesteraza
Fosfataze	$HO-P(=O)(OH)-O-C\lessgtr + H\cdot OH \rightleftarrows HO-P(=O)(OH)-OH + HO\cdot C\lessgtr$	Fosfataza renală, osoasă, intestinală
Pirofosfataza	$R-P(=O)(OH)-O-P(=O)(OH)-OH + H\cdot OH \rightleftarrows R-P(=O)(OH)-OH + HO-P(=O)(OH)-OH$	Adenozintrifosfataze, pirofosfataza din levură
Deaminaze	$>CH\cdot NH_2 + H\cdot OH \rightleftarrows >CH\cdot OH + NH_3$	Adenaza, guanaza, acid adenilicdeaminaza
Deamidinaze	$HN=C(NH_2)(NH) + H\cdot OH \rightleftarrows H_2N-C(=O)(NH_2) + NH_3$	Glutaminaza Asparaginaza Ureaza Arginaza

2. Fosforilaze

Reacția generală $R\cdot R' + H\cdot OP \rightleftarrows R\cdot OP + HR'$

Amilofosforilaze	$-O-CH(-O-)-OC\lessgtr + H\cdot OP \rightleftarrows -O-CH(-O-)-CHOP + HO\cdot C\lessgtr$	Plante și animale Amilofosforilaze Sucrofosforilaze
Nucleozidfosforilaza	$-O-CH(-O-)-CH-N\lessgtr + HOP \rightleftarrows CHOP + HN\lessgtr$	Inozinfosforilaza

(urmare tabelul 10)

3. Enzime ajutătoare

Substanța sau radicalul scindat	Reacția	Numele enzimelor
H_2O	$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$	Catalaza
	Malat $\rightleftarrows H_2O$ + fumarat	Fumaraza
	Citrat sau isocitrat $\rightleftarrows H_2O$ + aconitat	Aconitaza
	Lactat $\rightleftarrows H_2O$ + metilglioxal	Glioxalaza
	2 fosfoglicerat $\rightleftarrows H_2O$ + fosfoenolpiruvat	Enolaza
	H_2CO_3 $H_2O + CO_2$	Carbonicanhidraza
CO_2	$H_2CO_3 \rightleftarrows CO_2 + H_2O$	Carboxilaze
	CH_3CO $COOH \rightarrow CO_2 + CH_3CHO$	Carboxilaze
	$R-CH(NH_2).COOH \rightarrow CO_2 + R\,CH_2\,NH_2$	Aminoacid-decarboxilaze
	CH_2-COOH | $CO \cdot COOH$ $\rightleftarrows CO_2 + CH_2\,CO\,COOH$	β-carboxilaza
	Oxalosuccinat $\rightleftarrows CO_2$ + cetoglutarat	
NH_3	Aspartat $\rightleftarrows NH_3$ + fumarat	Aspartaza
Fosfohidroxiacetona	Fructofuranoza-1, 6-difosfat $\rightleftarrows$ fosfodihidroxiacetona + 3 fosfogliceraldehida	Zimohexaze (aldolaze)

II. *Enzimele de transfer*

Reacția generală: $A \vdots G \rightleftarrows A + B \vdots G$

1. Enzimele de oxidare și reducere (2 H transferați)

Clasa	Numele	Grupul donator	Grupul acceptor
Peroxidaze	Citocromperoxidaza	Citocrom C redus	$\rightarrow H_2O_2$
	Peroxidaza	Nespecific	$\rightarrow H_2O_2$
Oxidaze aerobe	Citocromoxidaza	Citocrom C, a_2	$\rightarrow O_2$
	Monofenoloxidaza	Mono- și difenoli	$\rightarrow O_2$
	Polifenoloxidaze	Di- și polifenoli	$\rightarrow O_2$
	Tirozinaza	Tirozina	$\rightarrow O_2$
	l-ascorbicoxidaza	Acidul *l*-ascorbic	
	Uricooxidaza	Acidul uric	
Dehidrogenaze aerobe	*d*-aminoacidoxidaze	*d*-aminoacizi	O_2 sau albastru de metilen
	d-glutamicoxidaze	*d*-acid glutamic	O_2 sau albastru de metilen
	Glicinoxidaza	Glicina	O_2 sau albastru de metilen
	l-aminoacidoxidaze	*l*-aminoacizi	O_2 sau albastru de metilen
	Xantinoxidaza	Hipoxantina, Xantina	O_2 sau albastru de metilen
	Aminooxidaze	Amine	O_2 sau albastru de metilen
	Diaminoxidaze	Diamine	O_2 sau albastru de metilen
Flavoproteine	Fermentul galben	Co I și II redusă	O_2 sau albastru de metilen
	Diaforaza	Co I redusă $\rightarrow$ albastru de metilen	O_2 sau albastru de metilen
	Citocromreductaza	Co II redusă $\rightarrow$ Citocrom C	O_2 sau albastru de metilen

Scanned with OKEN Scanner

(urmare tabelul 10)

Clasa	Numele	Grupul donator	Grupul acceptor
Dehidrogenaze anaerobe	**Tip I**		
	α–glicerofosfat –	*l*–α–glicerofosfat Succinat	⇄ Citocrom C sau albastru de metilen
	Tip II		
	Lactic –	*d*–lactat *l*–lactat	
	Malic –	*l*–malat	
	Triozofosfat –	*l*–3–fosfogliceraldehid + fosfat anorganic	
	Alcool (levură) –	Alcooli primari și secundari	⇄ Co I
	β–hidroxibutiric –	*l*–β–hidroxibutirat	
	Glucozo –	*d*–glucoza	
	l-glutamic –	*l*–glutamat	
	Tip III		
	Glucozo –	*d*–glucoza	
	l-glutamic –	*l*–glutamat	
	Hexozomonofosfat –	*d*–gluco-6-fosfat	⇄ Co II
	Izocitric –	*l*–izocitrat	

2. Alte enzime de transfer

Radical sau grup transferat	Clasa și numele	Grup donator	Grup acceptor
$-PO_3H_2$	Fosfokinaze	ATF	*d*–glucoza, fructoza,
	Hexokinaze Fosfoexokinaze	ATF	fructofuranzo-6-fosfat
	Miokinaza	ADF	⇄ ADF
$-NH_2$	Transaminaze		
	l–glutamic–transaminaza	Acid *l*–glutamic	⇄ α–cetoacizi
	l–aspartic–transaminaza	*l*–acid aspartic	⇄ α–cetoacizi
$-C(=NH)(NH_2)$	Transamidinaze	Arginina	→ Glicocol
$-CH_3$	Transmetilaze	Metionina	→ Etanolamina ← Glicociamina
$-SH$	Transtiolaze	Homocisteina	→ (Serina)

Scanned with OKEN Scanner

(urmare tabelul 10)

III. *Izomeraze*

1. Izomeraze simple

Nume	Reacţii
Aconitaza	Citrat ⇄ (aconitat) ⇄ izocitrat
Fosfotriozoizomeraza	Fosfodihidroxiacetona ⇄ 3-fosfogliceroaldehida
Oxoizomeraze	Glucozo-6-fosfat ⇄ fructofuranozo-6-fosfat

2. Mutaze

Fosfomutaze	
Fosfogliceromutaze	3-fosfoglicerol ⇄ 2-fosfoglicerol
Fosfoglucomutaza	Glucozo-6-fosfat ⇄ α-glucozo-1-fosfat

METODELE DE IZOLARE ŞI PURIFICARE A ENZIMELOR

Izolarea enzimelor

Enzimele pot fi izolate fie direct din celulele în care sunt elaborate, fie din lichidele în care sunt secretate şi unde îşi exercită acţiunea lor, de exemplu în salivă, suc gastric, suc pancreatic, plasma sanguină.

Izolarea enzimelor din lichidele biologice se face prin extracţie directă în diverse medii disolvante, de exemplu apă, soluţii alcaline sau acide, soluţii saline, glicerol.

Izolarea enzimelor din celule se poate face :

1. *prin extracţie directă* în aceleaşi lichide ca mai sus, când avem de a face cu exoenzime;

2. după *distrugerea prealabilă a celulelor* prin mijloace mecanice, pentru endoenzime şi prin mijloace chimice pentru desmoenzime şi ulterior extracţia lor în diverse lichide extractive.

1. **Extracţia directă** se face fie pe ţesutul ca atare, fie pe ţesutul în prealabil uscat cu acetonă sau eter, de preferat la temperaturi joase. Extracţia se face în apă la diverse valori de pH sau în diverşi solvenţi organici. Un solvent foarte utilizat este glicerolul anhidru.

2. **Extracţia după distrugerea celulei.** Se usucă ţesuturile cu acetonă sau eter şi ulterior se face distrugerea, fie mecanică, fie prin autoliză.

a) *Distrugerea mecanică se face prin triturare cu nisip de cuarţ* (cum a procedat Büchner pentru izolarea zimazei) sau prin *congelări şi decongelări succesive cu zăpadă carbonică.*

b) *Distrugerea prin autoliză* se face în prezenţa unor anumite substanţe antiseptice, cel mai utilizat fiind toluolul. Prin autoliză fracţionată se reuşeşte chiar să se extragă, după intervale diferite de autoliză, sisteme enzimatice separate.

După extracţia enzimelor din lichidele în care sunt active sau din celule în mod direct sau după distrugerea lor mecanică sau prin autoliză se face izolarea diverselor sisteme enzimatice şi purificarea enzimelor cu mijloace mai complicate.

Scanned with OKEN Scanner

Purificarea și concentrarea enzimelor

După izolarea enzimelor din lichide sau celule se procedează în lichidele de extracție la purificarea și concentrarea lor prin diverse metode, și anume:

1. prin precipitare fracționată cu diverși solvenți organici, o metodă care duce la preparate destul de pure. Cu această metodă, de exemplu, s'a obținut din extractul apos și extracție în acetonă ureaza cristalizată din fasolea Jack;

2. prin precipitare fracționată cu *săruri*, acestea la rândul lor îndepărtându-se ulterior prin dializă. Așa s'au preparat sub formă cristalizată tripsina, pepsina, catalaza, fermentul galben, ribonucleaza, timonucleaza, etc.;

3. prin precipitare fracționată la punctul isoelectric;

4. prin metoda cataforezei. Aceasta a fost utilizată de H. Theorell pentru obținerea fermentului galben;

5. prin adsorbția cromatografică.

Metoda cea mai fructuoasă care a dat însă cele mai frumoase rezultate este:

6. metoda adsorbției și eluției pe care o vom indica mai în detaliu.

Metoda adsorbției și eluției a fost desvoltată de Willstätter și școala lui (Waldschmidt-Leitz, Kraut). Această metodă reprezintă un progres important în studiul fermenților.

Principiul metodei este: adsorbția enzimelor dintr'un amestec pe un adsorbant specific și ulterior desfacerea de pe acest substrat a enzimei adsorbite.

Desfacerea de pe substrat se numește eluție, deaceea procedeul se numește al adsorbției și eluției.

Pentru alegerea substanței adsorbante se ia drept criteriu încărcarea electrică a enzimelor. Adsorbanții sunt în genere coloizi. Un foarte bun adsorbant al enzimelor s'a dovedit a fi caolinul (oxidul de siliciu și aluminiu) (slab acid) $Al_2O_3\ 2SiO_3\ 2H_2O$, care e încărcat negativ și va adsorbi enzimele încărcate pozitiv și hidratul de aluminiu, încărcat pozitiv (slab bazic), va adsorbi deci enzimele încărcate negativ. Are loc deci o precipitare reciprocă a doi coloizi. Se poate modifica încărcarea electrică prin variația pH-ului. Adsorbția va depinde deci de pH-ul mediului în care se lucrează.

Eluția ulterioară, adică desfacerea enzimei de pe adsorbant, se face variind din nou pH-ul sau adăugând anumite substanțe specifice, în raport cu enzima pe care vrem să o eliberăm (fosfat, amoniac, arsenat, etc.).

Vom da un exemplu de separare a enzimelor pancreatice conform unei scheme care se aplică în general tuturor sistemelor enzimatice.

Se taie pancreasul în bucăți mici, se usucă cu alcool și eter, pulberea uscată se extrage cu glicerol. Extractul glicerolat cuprinde lipaza, amilaza și tripsina în amestec și diversele componente din pancreas, solubile și ele în aceste lichide de extracție. Acest extract glicerolat se supune unor întregi operații de adsorbții și eluții succesive, cu hidrat de aluminiu în mediu acetic (Al. B. sau Al 13 special fabricat).

In precipitatul format, așa numitul adsorbat I, rămâne fixată 90%, din lipaza totală și 25% din amilază. In lichidul supernatant rămân disolvate tripsina 100%, care nu e adsorbită deloc de hidratul de aluminiu,

Scanned with OKEN Scanner

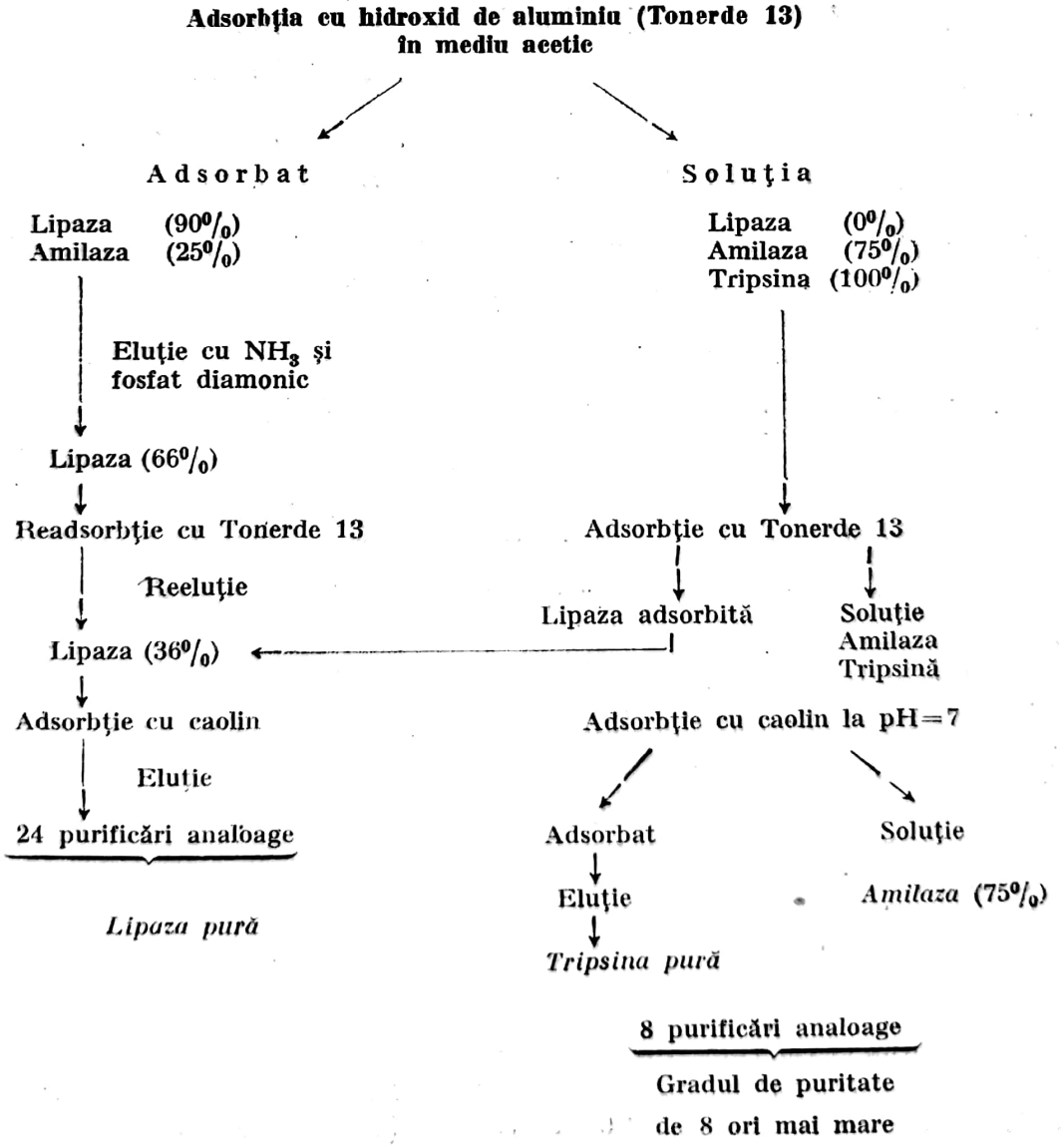
75% din amilază (deci majoritatea ei) și 10% din lipază. Atât adsorbatul I cât și soluția se tratează separat pentru alte adsorbții și eluții.

De pe adsorbatul I se face eluția cu NH_3 și fosfat diamonic. Se separă în lichidul de eluție 60% din lipaza adsorbită. De aici se readsoarbe cu hidrat de Al (15), se reeluează. Se separă lipaza 36%, dar mai pură. Din acest lichid de eluție se adsoarbe cu caolin, se eluează din nou. Se repetă în felul acesta mai departe 24 de adsorbții și eluții succesive și se obține o lipază pură și de 24 de ori mai concentrată decât lipaza inițială. In soluția I se procedează deasemenea la adsorbții și eluții succesive pe hidrat de Al (15), pe caolin la pH = 7 și se obține în adsorbatul final, după 8 adsorbții și eluții, o tripsină purificată de 8 ori față de cea inițială, iar în soluție 75% amilază (tabelul 11).

Tabelul 11

Schema purificării enzimelor din sucul pancreatic

Lipaza, amilaza, tripsina



Enzime cristalizate

Unele enzime au fost obținute sub formă cristalizată, pornindu-se dela enzime în prealabil purificate, care apoi se concentrează și se pun în condiții de suprasaturare. Aceasta se poate realiza în unele cazuri prin răcire la temperaturi joase, prin adăugare de mici cantități de sulfat de amoniu, de alcool, de acetonă sau prin dializă și separarea sărurilor. Pentru fiecare enzimă este însă necesară o metodă specială. Prima enzimă obținută sub forma cristalizată a fost *ureaza* (J. B. Sumner, 1926) extrasă din făina de fasole Jack, de unde se precipită cu acetonă (fasolea *Jack Canavalia ensiformis*). Cristalele au formă octaedrică și au o activitate de 7 000 de ori mai mare decât o cantitate echivalentă de făină (130 000 unități pentru 1 g enzimă). Northrop (1929) reușește să prepare pepsina cristalizată prin precipitare cu o soluție de sulfit de magneziu la pH=3. Cristalele sunt piramide cu baze hexagonale. Sunt optic active și au caracterele chimice ale unei proteine. Nu își pierde activitatea enzimatică prin cristalizare, ar corespunde deci formelor pure ale enzimei. Ulterior s'a reușit prepararea tripsinei, a amilazei cristalizate, a ribonucleazei, a timonucleazei, a catalazei, a arginazei.

Prin metoda cataforezei, H. Theorell obține o catalază cristalizată. Metoda aceasta dă cele mai pure preparate. Toate enzimele cristalizate au caracter proteinic.

DETERMINAREA CANTITATIVĂ A ENZIMELOR

Activitatea unei enzime se măsoară prin determinarea cantității de substrat transformat de enzimă în condiții bine precizate.

Activitatea enzimelor se exprimă în *„unități enzimatice"*. Aceste unități sunt arbitrar alese pentru fiecare enzimă în *condiții standard* de pH, *de temperatură, de concentrație a substratului.* „Unitatea enzimatică" după Willstätter și Kuhn este definită ca acea cantitate de enzimă care în anumite condiții de pH, de temperatură și de concentrație a substratului transformă într'un interval dat o cantitate fixă de substrat. Vom vedea la enzimele respective cum e definită pentru fiecare enzimă unitarea respectivă. Astfel :

unitatea tripsină este, după Willstätter, cantitatea de tripsină capabilă de a elibera din cazeină grupări carboxilice echivalente la 1,05 cc dintr'o soluție 0,2 n de hidrat în 20 de minute la 30° ;

unitatea de lipază e cantitatea de lipază care hidrolizează 24% din 2,5 g ulei de măsline într'o oră la 30°, la un pH inițial de 8,9 în prezența a 15 mg albumină și 10 mg clorură de calciu.

Gradul de puritate al unei enzime se măsoară în *valori enzimatice*. Valoarea enzimatică e numărul de unități cuprinse într'un gram sau mg enzimă. Cu cât enzima e mai pură, cu atât valoarea enzimatică e mai mare. O constantă care poate caracteriza activitatea unei enzime este așa numitul „număr de transfer", noțiune sub care se înțelege numărul care reprezintă de câte ori un mol enzimă poate transforma un mol substrat pe minut la o anumită temperatură. De exemplu : un mol codehidrază I poate fi redus și reoxidat de o mie de ori ; acest lucru va duce la oxidarea a o mie de molecule de substrat pe minut la o temperatură dată. Dăm un tabel de aceste numere pentru enzime (v. tabelul 12)

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 12

Valorile „numerelor de transfer" al câtorva enzime

Enzima	T°	Mol substrat transformat de un mol enzimă pe minut
Catalaza	0°	$2{,}5 \times 10^6$
Citocrom	38°	$1{,}4 \times 10^3$
Carboxilaza	30°	$1{,}0 \times 10^3$

HIDROLAZELE

Hidrolazele sunt enzimele care catalizează reacția de scindare a moleculelor cu fixarea componentelor apei la produsele de scindare.

De exemplu, desfacerea proteinelor în aminoacizi, a polizaharidelor în monozaharide, a lipidelor în acizi grași și glicerol, a esterilor în general în acizii și alcoolii componenți.

Reacțiile catalizate de către hidrolaze sunt reacții care se produc cu modificări energetice mici, cu degajare de energie liberă mică, deci nu constituie o sursă energetică importantă pentru organism. Hidrolazele au un rol totuși important în metabolismul substanțelor de alimentație, ele degradând moleculele mari care intră în compoziția alimentelor la molecule componente simple. Vom prezenta pe cele mai importante.

ENZIMELE CARE SCINDEAZĂ LEGĂTURA —C—O—

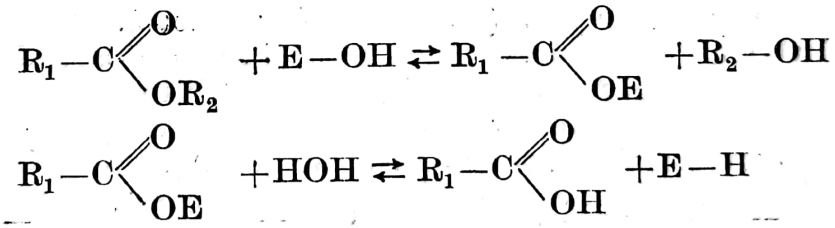
I. Esterazele

Esterazele sunt enzimele care catalizează reacția reversibilă de scindare a esterilor în acidul și alcoolul corespunzător:

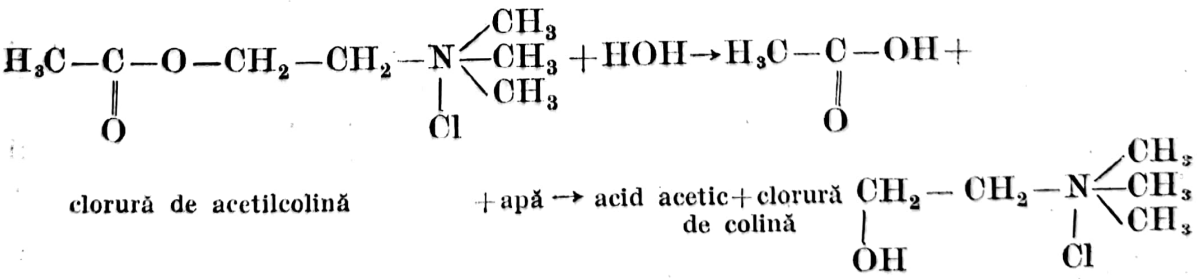
$$R_1—COO—R + HOH \rightleftarrows R_1—COOH + R—OH$$

Ester + apă ⇄ Acid + alcool

Dacă se admite că enzima conține în moleculă o grupare alcoolică, mecanismul său de acțiune ar fi după Lagenbeck următorul:



Acidul și alcoolul asupra cărora lucrează esterazele pot fi monoatomici sau poliatomici și după natura lor chimică există diverse esteraze. De exemplu: *colinesteraza,* care are un rol foarte important, catalizează în organism desfacerea acetilcolinei în colină și acid acetic:



clorură de acetilcolină + apă → acid acetic + clorură de colină

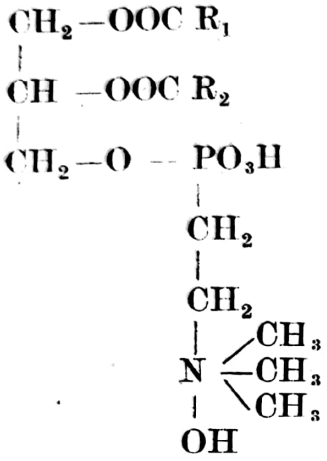
Formarea și desfacera acetilcolinei sunt considerate ca un proces intracelular direct dependent de acțiunea nervilor, legat de transmiterea

impulsului nervos. Hidroliza acetilcolinei este ireversibilă, colinesteraza funcţionând numai în reacţie de desfacere; resinteza ar fi datorită unei alte enzime, *colinacetilaza* (deoarece se pare că descreşterea de energie este foarte mare în reacţia de desfacere).

Colesterolesteraza catalizează reacţia de desfacere a esterilor colesterolului cu acizi graşi superiori.

Lecitinazele

Catalizează reacţia de desfacere a esterilor lecitinei cu acizi graşi superiori:



α-lecitina

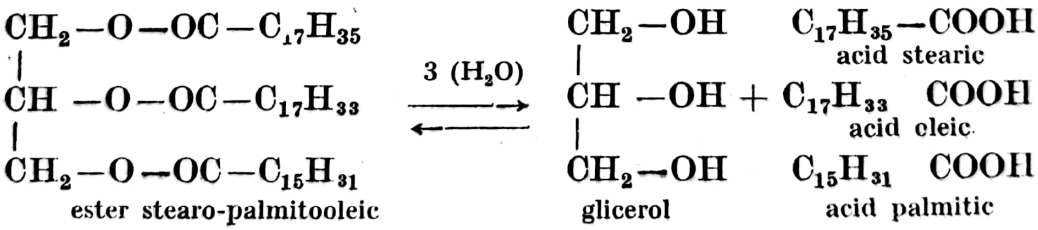
Există lecitinaze A şi B. Lecitinazele A se găsesc în veninul şerpilor, scorpionului, în pancreas; lecitinazele B se găsesc în ficat, pancreas, inimă, splină.

Lecitinazele din veninul şerpilor şi scorpionului catalizează reacţia de scindare numai a unui singur radical de acid gras, eliberând un compus care păstrează în moleculă acidul gras saturat, compus cunoscut sub numele de lizolecitină din cauza proprietăţii sale hemolitice intense. Acestei acţiuni i se atribue toxicitatea unor veninuri care, prin acest mecanism, produc turburări ale funcţiei respiratorii a sângelui.

Lipazele

Sunt o grupă foarte importantă a hidrolazelor; catalizează reacţia de scindare a esterilor glicerolului cu acizi graşi superiori. In organismul animal se găsesc în sucul gastric, salivă, suc pancreatic, dar şi în organe (de exemplu, în ficat). Se cunosc multe lipaze vegetale; dintre acestea, mai cunoscută este lipaza din ricin.

Lipaza gastrică se găseşte în sucul gastric, pH-ul său de activitate variind cu specia animală. Lipaza pancreatică se găseşte în pancreas şi sucul pancreatic. Hidrolizează grăsimile în acizi graşi şi glicerol.



ester stearo-palmitooleic — glicerol — acid stearic — acid oleic — acid palmitic

Lipazele nu au o specificitate marcată, dar viteza lor de acţiune variază cu origina. Prezintă deasemenea o specificitate stereochimică: unul din izomerii aceluiaşi corp este mai repede atacat decât celălalt.

O caracteristică a lipazelor, este viteza cu care realizează echilibrul reacţiei, respectiv sinteza şi degradarea substratului. Cei trei radicali ai acizilor graşi din trigliceride nu sunt scindaţi simultan, ci succesiv, ceeace este important din punctul de vedere al absorbţiei grăsimilor. O altă caracteristică a acestor enzime este uşurinţa cu care realizează atât sinteza, cât şi hidroliza grăsimilor (v. fig. 74, reprezentând curba hidrolizei şi sinteza trioleinei de către lipaza din ricin).

Scanned with OKEN Scanner

Acţiunea catalitică a lipazelor este extrem de mult influenţată de substanţele străine din sistemul unde acţionează : unele sunt stimulante, altele inhibante ; deaceea determinarea ei trebue făcută în condiţii standard, în aşa fel alese încât influenţele străine să fie reduse la minim. Adăugarea în aceste sisteme de $CaCl_2$ şi albumine realizează tocmai aceste condiţii şi „unitatea lipazică" e definită după Willstätter, Waldschmidt-Leitz, ca fiind cantitatea de lipază care hidrolizează 24 % din 25 g ulei de măsline în interval de o oră la 30°, pH = 8,9 şi în prezenţa a 15 mg albumine şi 10 mg clorură de calciu, volumul total fiind 13 cc.

Albumina ar avea rolul să fixeze pe molecula sa atât substratul, cât şi lipaza, realizând astfel o apropiere spaţială mai mare între aceste două sisteme.

O caracteristică a lipazelor este uşurinţa cu care catalizează atât reacţia de sinteză, cât şi cea de degradare, şi uşurinţa cu care se stabileşte echilibrul final, acesta fiind acelaş dacă se porneşte dela grăsimea ca atare sau dela componentele de desfacere (v. fig. 74 în care se indică hidroliza şi sinteza trioleinei sub acţiunea lipazei din ricin).

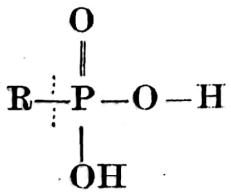
Fosfatazele

Catalizează hidroliza esterilor acidului fosforic. Constitue o grupă extrem de importantă a esterazelor, deoarece esterii organici ai acidului fosforic sunt componente care intervin în aproape toate procesele biologice esenţiale legate de metabolismul glucidelor, al nucleotidelor, al fosfolipidelor. Ei intervin în formarea oaselor, în mecanismul contracţiei musculare.

Până acum s'au diferenţiat 15—20 de fosfataze.

Clasificarea fosfatazelor

1. **Fosfomonoesterazele** hidrolizează monoesterii acidului fosforic :



Se împart la rândul lor în raport cu pH-ul lor optim de acţiune în :

a) *fosfataze alcaline,* care au pH-ul optim la 9 ; se găsesc în sânge, în oase ;

b) *fosfataze acide,* unele cu un pH optim 4,5—5,5, se găsesc în special în ţesuturi şi rinichi ; altele, cu un pH optim la 4, se găsesc în special în ţesuturi ;

c) *fosfataza cu un pH optim* = 6,4 se mai numeşte fosfataza din eritrocite.

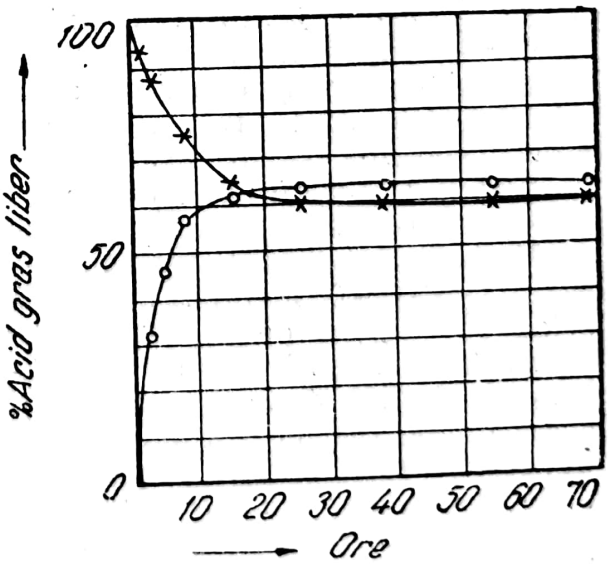
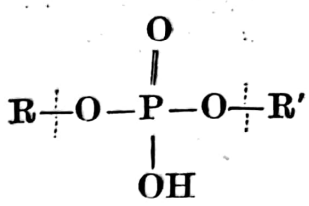


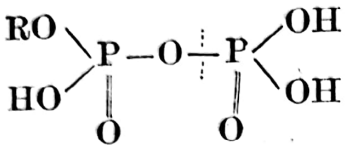
Fig. 74. Hidroliza şi sinteza trioleinei sub acţiunea catalitică a lipazei din ricin

2. **Fosfodiesterazele** hidrolizează diesterii acidului fosforic (esterdiglicerol fosforic, esterdifenil fosforic, esterdietil fosforic, etc.):



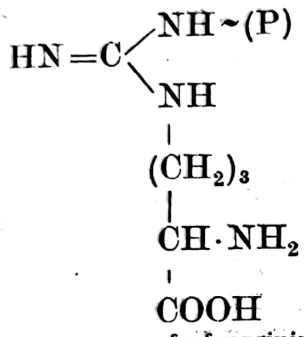
3. **Pirofosfatazele** catalizează hidroliza esterilor acidului pirofosforic, cu eliberare de acid fosforic.

O pirofosfatază extrem de importantă în organism este adenilpirofosfataza, care are drept substrat acidul adenozintrifosforic, cu rol fundamental în procesul de degradare a glucidelor în mușchi și în acela al contracției musculare.

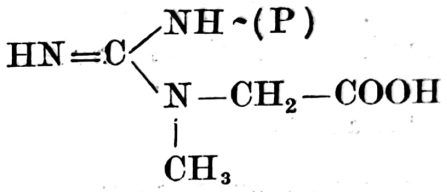


4. **Metafosfatazele** catalizează hidroliza sărurilor acidului metafosforic (metafosfatul de sodiu).

5. **Fosfoamidazele** catalizează hidroliza compușilor de tipul amidelor — N — substitute ale acidului fosforic:



fosfoarginina



fosfocreatina

Fosfatazele sunt prezente în toate celulele vii, în oase, în dinți, în plasma sanguină, în eritrocite, în leucocite, ficat, rinichi, prostată, epitelii intestinale, urină, etc. Se obțin din aceste organe, în extracte apoase ale țesutului triturat.

Fosfatazele au rol important în procesul de osificare a țesutului cartilaginos (oase, dinți).

Fosfataza osoasă are pH-ul optim 9,5; se găsește în special în epifiza oaselor lungi. Intervine în procesul de calcificare, catalizând hidroliza fosfaților organici și eliberând astfel fosfații necesari precipitării fosfatului tricalcic, care intră în structura oaselor (Robinson). Pentru activitatea fosfatazei osoase este indispensabilă prezența ionilor Mg^{++}.

Fosfataza din eritrocite. Eritrocitele conțin două fosfataze: una cu un pH optim 6,2, alta cu un pH optim 9,2.

Fosfataza din ser. Serul conține o fosfatază așa zisă alcalină cu un pH optim la 9,0, identică probabil cu fosfataza din oase, și o fosfatază acidă cu optimul de activitate la pH = 4 — 6,5. Valorile normale ale fosfatazei alcaline în ser sunt: 1,5—4,0 unități Budanschi (100 cc ser). Determinarea fosfatazei acide este folosită pentru stabilirea unui diagnostic diferențial în cazurile de metastaze canceroase de origină prostatică; în aceste cazuri, valorile sunt crescute (vezi cap. sângele). Valorile normale ale fosfatazei acide în ser sunt foarte mici, uneori nedozabile.

Fosfatazele renale. Rinichiul conține o fosfatază alcalină cu pH optim 9,0—9,5, activată de ionii Mg^{++}; Mn^{++}; Co^{++} și inhibată de ionii KCN și Na_2S, și o fosfatază acidă cu pH optim 5,6—6,0.

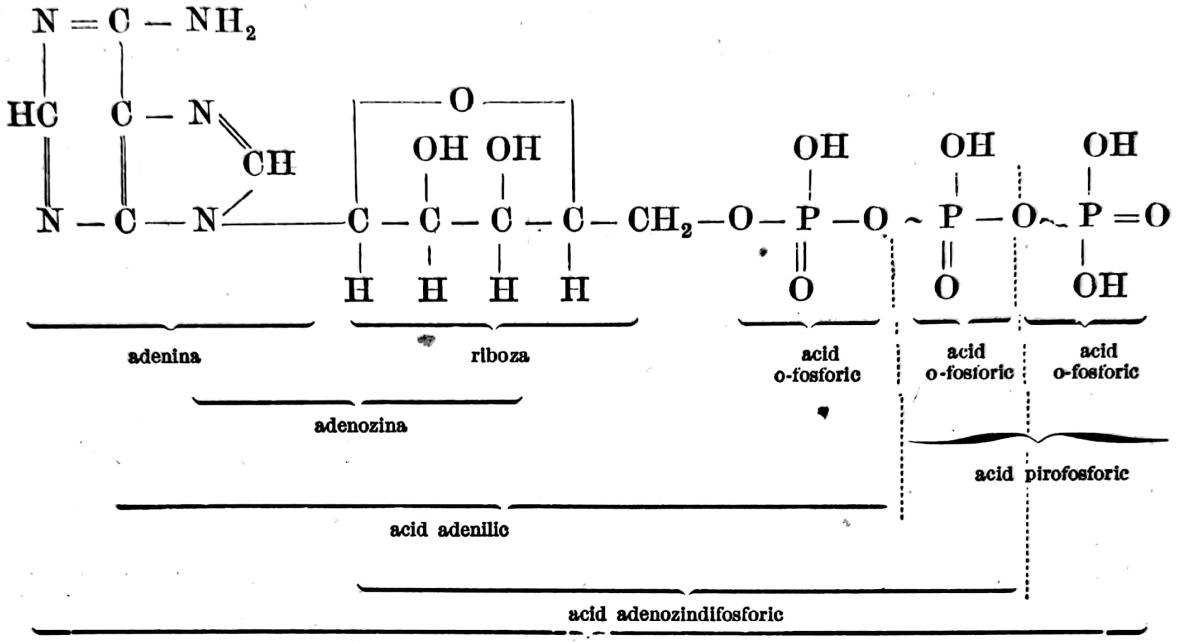
In ficat există deasemenea o fosfatază acidă și una alcalină,.

Scanned with OKEN Scanner

Fosfataza din epiteliul intestinal e o fosfatază alcalină la fel cu cea din lapte.

Fosfataza din lapte este distrusă prin pasteurizarea laptelui. Acest fapt se ia ca indicator al unei pasteurizări eficace.

6. **Adenilpirofosfatazele** sunt de o importanţă biologică considerabilă; au drept substrat acidul adenozintrifosforic şi acidul adenozindifosforic.



acid adenozintrifosforic

Sub acţiunea adenozintrifosfatazei, acidul adenozintrifosforic scindează gruparea terminală de acid fosforic şi acidul adenozindifosforic, cu eliberare mare de energie. Lucrările autorilor ruşi Engelhardt şi Liubimova, confirmate de numeroşi cercetători, au arătat că enzima care în muşchi catalizează hidroliza acidului adenozintrifosforic, este însăşi proteina musculară, miozina.

Se ştie că hidroliza acidului adenozintrifosforic este sursa energetică pentru contracţia musculară. Se vede deci cât de importante sunt aceste fenomene. Lucrările citate mai sus arată că adenozintrifosfataza, care catalizează această reacţie, e identică cu miozina musculară; în adevăr, miozina din muşchi, preparată prin precipitări repetate, hidrolizează acidul adenozintrifosforic la acid adenozindifosforic. Purificarea miozinei pe cale electroforetică şi prin ultracentrifugare, arată că e formată dintr'o singură componentă care, izolată, are o activitate de aproximativ 90% din preparatul iniţial. Miozina este în acelaş timp substanţa contractilă din muşchi. Dacă se ia o soluţie de miozină şi se lasă să curgă printr'un orificiu subţire se produc fibre care seamănă în unele puncte cu fibrele musculare. Se pot contracta şi alungi în funcţie de ionii din soluţia în care sunt introduse. Astfel, Engelhardt şi colaboratorii au arătat că fibrele se alungesc dacă se introduc în soluţie cantităţi mici de acid adenozintrifosforic. Se deosebesc două miozine, după felul lor de preparare: miozina A şi B. Miozina B are fibre care introduse în soluţie apoasă se contractă rapid, KCl, $MgCl_2$ şi adenozintrifosfatul fiind necesare pentru a putea produce o asemenea contracţie rapidă. Fibra contractată, pusă însă în soluţie mai concentrată de KCl, se relaxează.

Injectarea de adenozintrifosfat în mușchiul neted, pe cale arterială, produce contracții tetanice rapide. Se vede deci legătura dintre adenozintrifosfat și miozină în procesul contracției musculare. Se determină activitatea adenozintrifosfatazică în țesuturi, mușchi dozând acidul fosforic (orto) eliberat în interval foarte scurt (7′—10′) din acidul adenozintrifosforic la pH 9,0 în prezența calciului. Adenozintrifosfataza scindează numai gruparea terminală din acidul ATF (adenozintrifosforic). Acidul adenozindifosforic (ADF) poate elibera una din grupările sale fosforice sub acțiunea unei enzime, miokinaza, care catalizează în mod specific transferul unui radical fosfat pe o altă moleculă de acid ADF cu formare de acid adezinmonofosforic (acid adenilic AA) și acid adezintrifosforic :

$$2\ ADF \rightleftarrows AA + ATF$$

sau, dacă se pun în evidență grupările fosfat puternic energetice :

$$2\ A-P\sim P \rightleftarrows A-A+A-P\sim P\sim P$$

II. Nucleazele

Nucleazele sunt enzimele care catalizează degradarea acizilor nucleici. Cuprind enzimele de depolimerizare sau polinucleotidazele, nucleotidazele sau nucleofosfatazele și nucleozidazele.

Enzimele de depolimerizare

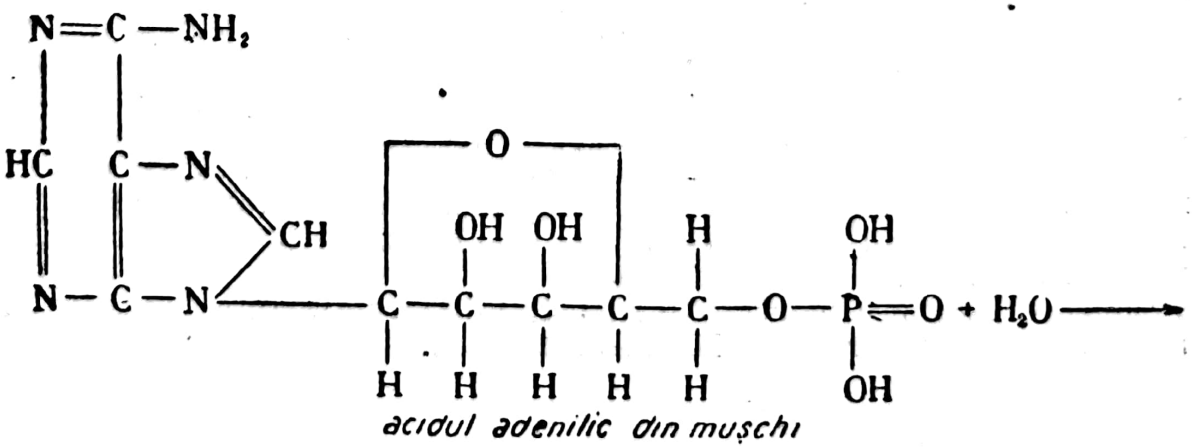
desfac molecula mare, puternic polimerizată a acizilor nucleici până la mononucleotide. Nu eliberează acid fosforic. Enzimele de depolimerizare sunt :

ribonucleaza, care are drept substrat acidul ribonucleic (greutate moleculară 100 000). Acidul ribonucleic se prepară din levură. Ribonucleaza are pH optim 7,6 rezistă la temperaturi de 80° ;

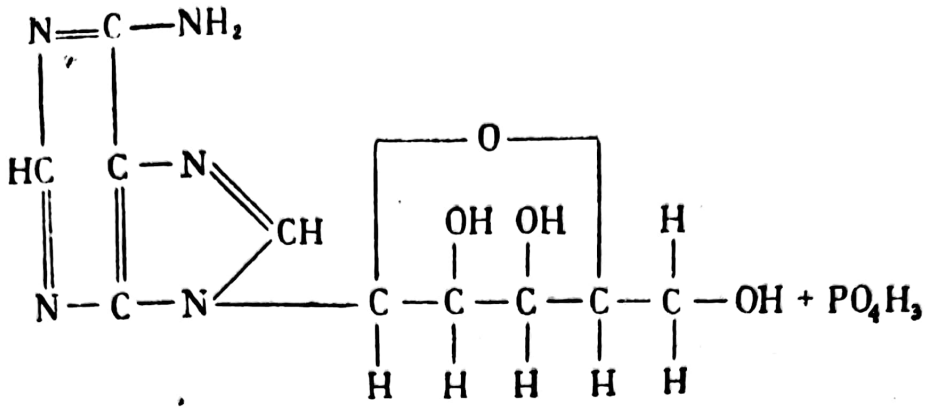
timonucleodepolimeraza e enzima care are drept substrat acidul timonucleic, pe care îl degradează până la mononucleotide. Ambele enzime au un rol extrem de important în celule. Cu ajutorul lor s'a reușit a se pune în evidență existența unui nucleu la bacterii, fapt multă vreme contestat.

Nucleotidazele

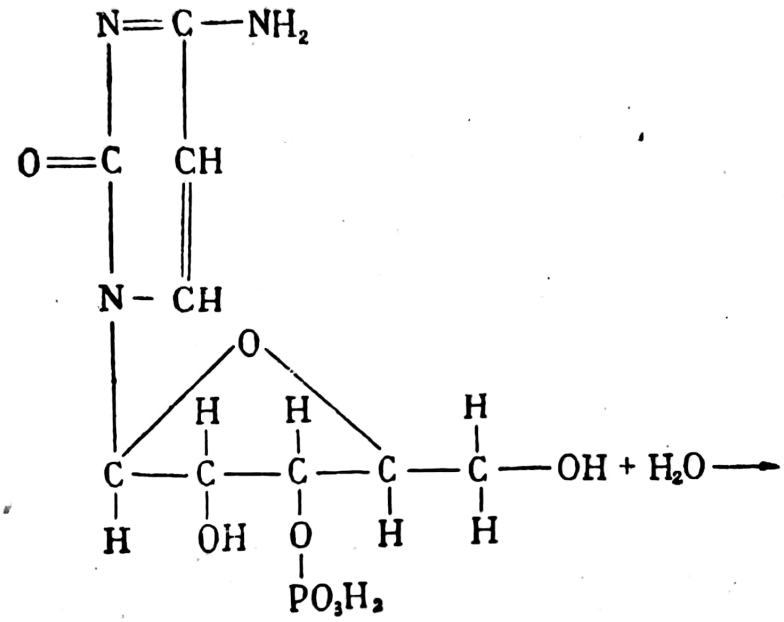
Nucleotidazele sau nucleofosfatazele sunt fosfataze, catalizează reacția de desfacere a acidului fosforic din nucleotide, eliberând nucleozidele. Atacă atât nucleotidele pirimidinice, cât și cele purinice. Există astfel nucleotidaza adenilică corespunzătoare acidului adenilic ; nucleotidaza citidinică corespunde acidului citidilic.



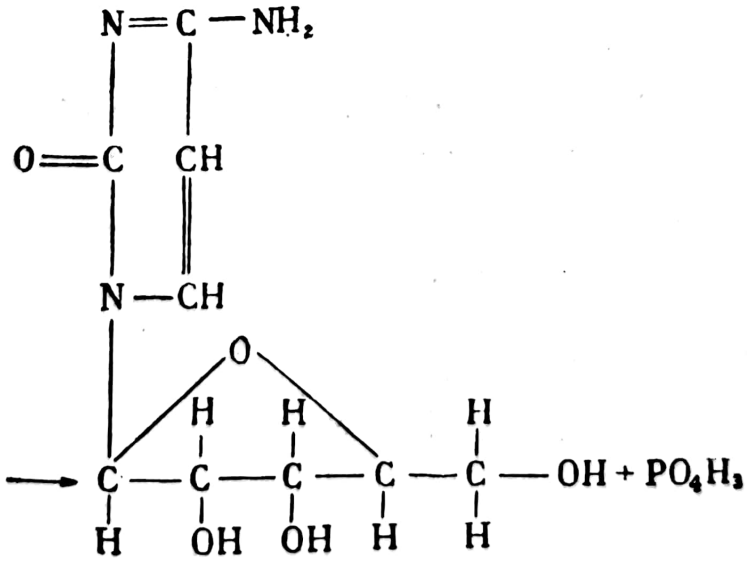
acidul adenilic din mușchi



adenozină



acid citidilic



citidină

III. Fosforilazele, transfosforilazele, fosfoizomerazele, fosfomutazele

Sunt enzimele ce catalizează reacţii în care intervin deplasări de grupări fosforice. Ele joacă un rol important în metabolismul glucidelor şi lipidelor.

Fosforilaza

Are analogie cu enzimele hidrolitice, numai că în loc să facă scindarea substratului cu fixarea elementelor apei la componentele scindate, face fixarea grupării fosfat şi OH la componentele scindate :

$$R-O-R'+HOH \rightarrow R-OH+R'-OH$$

$$R-O-R' + HO-P(=O)(OH)-OH \longrightarrow R-OH + R'-P(=O)(OH)-OH$$

Astfel, o *fosforilază* face transformarea glicogenului în ester glucozo-1-fosforic, scindând molecula glicogenului şi fixând radicalul fosforic la moleculele scindate.

Transfosforilazele

Catalizează reacţia de transfer a grupării fosfat de pe un compus pe altul. De exemplu, transportul grupării fosfat de pe acidul difosfogliceric pe acidul adenozindifosforic cu regenerarea acidului adenozintrifosforic; de pe fosfocreatină pe acid adenilic, cu reformarea creatinei şi acidului adenozintrifosforic.

Fosfomutazele

Catalizează reacţia de transfer al radicalului fosforic dela poziţia sa într'o moleculă, la altă poziţie din aceeaşi moleculă. De exemplu, fosfoglucomutaza catalizează reacţia de transfer glucoză-1-acid fosforic la glucozo-6-acid fosforic.

Fosfoizomerazele

Catalizează reacţia de transfer de pe un substrat pe izomerul său, de exemplu, de pe glucoză-6-fosfat la fructozo-6-fosfat.

IV. Sulfatazele

Catalizează hidroliza esterilor acidului sulfuric şi în special acizii sulfurici cuplaţi, sulfaţii fenolici, acidul indoxilsulfuric, etc., care apar ca produse de eliminare.

Există fenolsulfataze, gluçosulfataze, condrosulfataze. Se găsesc aproape în toate organele; cea mai mare activitate o au sulfatazele renale.

V. Carbohidrazele

Sunt enzimele care catalizează h droliza glucidelor. Sunt caracterizate printr'o *mare specificitate. Specificitatea strânsă a carbohidrazelor se manifestă*

în raport cu trei caractere ale substratului, şi anume : 1) *izomeria zaharului,* în legătură cu prezenţa unei grupări aldozice sau cetozice ; 2) *izomeria* α, β legată de stereoizomeria compusului ; enzimele care scindează α-glicozidele, nu scindează β-glicozidele ; specificitatea faţă de 3) *izomeria inelului* sau izomeria de ciclu se manifestă în raport cu forma piranozică sau furanozică a substratului. Pentru a explica această specificitate de izomerie se atribue coenzimei carbohidrazelor structura unui glucid. Carbohidrazele se împart în două grupe mari : *poliazele* sau *amilazele* şi *hexozidazele.*

A. Poliaze, amilaze sau diastaze

Catalizează hidroliza amidonului şi glicogenului până la dizaharid (maltoză). Se găsesc în malţ, drojdie de bere, salivă, suc pancreatic şi diverse organe, în special în ficat şi muşchi. Se disting α şi β amilaze. Primele duc la α-maltoză, cele de al doilea la β-maltoză, cele două forme izomere ale maltozei, care se deosebesc între ele prin valoarea mutarotaţiei. Amilaza pancreatică este o α-amilază. Se găseşte în malţ o amilază care este un amestec de α şi β-amilază. Deoarece amidonul conţine numai legături α, se presupune că în momentul hidrolizei se face o inversiune. Glicogenul este atacat numai de α-amilază. Acţiunea celor două enzime e diferită ; astfel, α-amilaza desface molecula amidonului în fragmente relativ mari (dextrina) şi foarte încet până la maltoză, deaceea i se mai zice şi enzima dextrinogenă. β-amilaza dă naştere dintr'un început maltozei (mai poartă numele de amilază zaharogenă sau amilază maltogenă). Se admite că β-amilaza atacă macromoleculele, desprinzând moleculele de maltoză una câte una, până ce totul e transformat în maltoză. In 1940, K. H. Mayer, bazat pe acţiunea enzimelor, a ajuns la o interpretare asupra structurii amilazei, care ar fi neramificată şi cu un grad mic de polimerizare (200—300 radicali α-glucoză). Amilopectina are o greutate moleculară mare (500 000) şi un grad de polimerizare mare (3 000). Ar avea structură ramificată, fiind formată din unităţi de câte 20—24 radicali unite între ele α-glicozidic. Glicogenul ar avea deasemenea un număr mare de unităţi de catene, fiecare conţinând 12—18 radicali de glucoză.

Amiloza este transformată în întregime în maltoză de către β-amilaza ; *amilopectina,* dimpotrivă, numai în proporţie de 55%, rămânând o dextrină macromoleculară, α-amilodextrina (dextrina I) care dă o coloraţie bordo cu iodul ; ea este atacată de α-glicozidaza şi de α-amilaza dextrinogenă care scindează resturi de glucoză şi alte dextrine ce nu mai dau nicio coloraţie cu iodul (dextrina II). Noul produs este din nou hidrolizat de β-amilază, care duce la maltoză şi o altă dextrină III, cu moleculă mai mică. Amilopectina reprezintă cam 64% din amidon, are o catenă ramificată şi numai catenele exterioare ale lanţului de glucoză sunt desfăcute de β-amilază. Acţiunea încetează când se ajunge la locul de ramificaţie al catenei, unde intervine α-glicozidaza. Fiecare din aceste două amilaze singură nu poate scinda complect amidonul sau glicogenul la maltoză. Pentru aceasta trebue să lucreze împreună.

Amilazele digestive (salivară şi pancreatică) nu au fost diferenţiate în amilaze dextrinogene şi maltogene. Transformă intens amidonul în maltoză. Sunt probabil amestecuri.

La plante, amilaza transformă rezerva de glucide aflată sub formă de amidon, în maltoză, care, sub această formă, poate fi transportată şi

Scanned with OKEN Scanner

utilizată. Semințele negerminate ale diverselor cereale conțin amilază liberă, ce poate fi extrasă ușor cu apă, și amilază „legată", care nu poate fi extrasă și este inactivă. In timpul germinației, amilaza legată e eliberată și activată. Amilaza legată ar fi sinonimă cu α-amilaza și cea liberă cu β-amilaza.

Cercetătorii sovietici Bach, Oparin, Wähner, Cursanov, Dojacov, au găsit variații mari în activitatea amilazei în timpul maturației semințelor. S'a constatat că valoarea cantitativă a unui ferment la plante nu e fixă. După Oparin, amilaza apare în timpul coacerii semințelor în endosperm, iar inactivarea și activarea se explică printr'o adsorbție, respectiv o desfacere de pe anumite structuri de plantă. Astfel s'a găsit că amilaza e puternic adsorbită de țesutul tânăr și pierde proprietățile sale enzimatice pe care le recapătă prin eluție. Procesele fermentative în endosperm și mugure (etiolat) sunt profund schimbate la înverzirea frunzei, în care se face atât hidroliza, cât și sinteza. In prima jumătate a zilei are loc o creștere a puterii de sinteză; spre seară încep să predomine procesele de hidroliză și substanțele acumulate în timpul zilei în frunze sunt transportate către diferitele părți ale plantei. Cursanov, prin experiențe directe (prin metoda infiltrației în vid), arată că frunzele adsorb fermenții hidrolitici la lumină și îi eliberează la întuneric. Există deci un ritm zilnic al reacțiilor fermentative. La plante, amilazele transformă rezerva de glucide într'o formă transportabilă. Maltaza la animale are rol în digestie.

Amilaza pancreatică și salivară (ptialina) e inactivă ca atare și devine activă sub acțiunea unor ioni (ionii Cl, J). Amilaza din malț nu e influențată de electrolite. Amilazele sunt activate în mod special de ionul Cl. Anionul Cl pare să fie pentru amilaza salivară o adevărată coenzimă. E posibil ca disocierea enzimei să fie diferită în prezența ionilor Cl.

pH-ul optim de activitate al diverselor amilaze e diferit (v. tab. 13).

Tabelul 13

Amilaza	din	salivă	și pancreas	are pH	6,0—6,1	pe substrat amidon
„		intestin		7	„	„ „
„		ficat		6	„	„ „
„		malț		5	„	„ „
„		mușchi		7		glicogen

In ultimul timp s'a reușit prepararea unei amilaze cristalizate.

Polizaharidele și în special glicogenul sunt degradate în organismul viu în special pe calea fosforilării sub acțiunea fosforilazelor.

Fosforilazele sunt enzimele care desfac legătura glicozidică cu fixarea nu a componentelor apei (HO—H), ci a acidului fosforic $HO—PO_3H_2$, iar produsul de scindare este α-glucozo-1-fosfat. Vom vedea că aceste enzime intervin în degradarea glicogenului muscular. Cu ajutorul fosforilazei s'a reușit sinteza polizaharidelor, respectiv a glicogenului, pornind dela α-glucozo-1-fosfat. Acest lucru este posibil, deoarece nivelul energiei libere este aproximativ același pentru ambele; acest nivel fiind mai mic pentru glucoza liberă, care trebue să fie în prealabil fosforilată pentru a forma glicogenul; crește prin fosforilare și condițiile energetice vor fi cele necesare pentru ca reacția să aibă loc.

Celulaza, enzima care degradează celuloza, se găsește la extrem de puține animale. A fost descrisă la unele gastropode ierbivore. La ani-

Scanned with OKEN Scanner

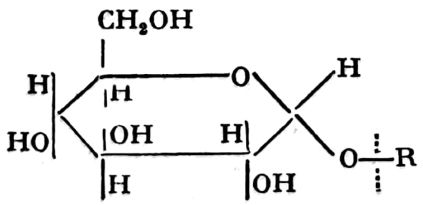
malele care se hrănesc cu celuloză, microorganismele din tractul digestiv o degradează.

Hialuronidaza sau „factorul de difuziune" este o carbohidrază descoperită în 1928. Se pare că are un rol important în fenomenul de fertilizare. Se găseşte în testiculi, bacteriile invadatoare, insectele veninoase, în veninul şerpilor, în autolizatele unor microbi (pneumococi, streptococi). Substratul acestei enzime este acidul hialuronic, un compus format din N-acetilglucozamină şi acid glicuronic în proporţii echimoleculare, substrat care se găseşte în mare cantitate în cordonul ombilical, lichidele sinoviale. S'a constatat că hialuronidaza extrasă din testiculi, prezentă în spermatozoizi, disolvă învelişul care înconjoară ovulul, ceeace a făcut să se atribue acestei enzime rolul de a înlătura acest gel vîscos format din acid hialuronic şi de a permite astfel pătrunderea spermatozoidului în ovul. Se atribue deasemenea acestei enzime rolul de a permite difuzarea în organism a diverselor substanţe prin permeabilizarea barierelor constituite de acidul hialuronic din substanţa fundamentală a ţesutului conjunctiv. Difuziunea bacteriilor invadatoare şi a veninului şerpilor în organism se atribue tot prezenţei acestei enzime. S'a găsit însă în plasma sanguină normală o antienzimă care distruge hialuronidaza şi apără astfel organismul (antiinvazina I) împotriva pătrunderii bacteriilor, veninului, etc. Cercetări recente au dovedit structura proteinică a hialuronidazelor.

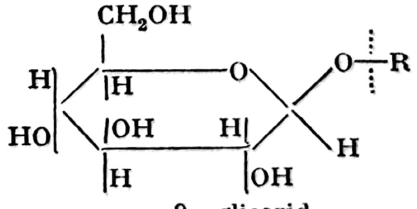
B. **Hexozidazele**

Catalizează hidroliza glicozidelor şi dizaharidelor în monozaharide. Principalele hexozidaze sunt:

Enzime	*Substrat*
1) α-glicozidaza	α-glicozide, maltoza, zaharoza
2) β-glicozidaza	β-glicozide, amigdalina, celobioza, gentiobioza,
3) α-galactozidaza	α-galactozide, melibioza, rafinoza
4) β-galactozide	β-galactozide, lactoza
5) invertaza	β-fructofuranozide, zaharoza, rafinoza, inulina.



α — glicozid



β — glicozid

Maltaza este o glicozidază, hidrolizează maltoza în două molecule de glucoză. Este foarte răspândită în natură, atât la plante, cât şi la animale. Se găseşte în cantităţi mari în sucul pancreatic, în cantităţi mici în sucul intestinal. pH-ul optim de activitate =6,75—7,25.

Emulsina este un amestec de enzime în care predomină:

a) *β-glicozidaza* este sistemul fermentativ conţinut în migdalele amare, al cărui substrat este amigdalina (care prin hidroliză se desface în două molecule de glucoză, una de benzaldehidă şi una de acid cianhidric); este o gentiobioză a nitrilului mandelic.

Scanned with OKEN Scanner

In emulsină, alături de β-glicozidaze care scindează amigdalina în β-glucoză + prunazină (prunazina este monoglicozidul acidului nitric mandelic) mai există :

b) prunaza, care scindează şi celălalt rest de glucoză + nitrilul acidului mandelic şi

c) o *oxinitrilază* care desface nitrilul în aldehidă benzoică şi acid cianhidric, produsele finale de scindare.

Lactaza este o β-galactozidază, care catalizează hidroliza lactozei în o moleculă de glucoză şi una de galactoză. Se găseşte în sucul intestinal. Are pH-ul optim 5,0. Fapt interesant e că apare în sucul intestinal numai când în alimentaţie există lactoza. Este un exemplu de ceeace se numeşte „formaţiune adaptativă a enzimelor". (Anumite organe au capacitatea de a produce un ferment, dar nu o fac decât în momentul când activitatea acestui ferment e necesară).

Invertaza (invertina) sau zaharaza catalizează hidroliza zaharozei în glucoză şi fructoză (levuloză) (fig. 75). Se pot distinge două tipuri de zaharaze : glucozaharaze (în secreţiile digestive ale animalelor) şi fructozaharaze (în levură). Zaharoza fiind α-glicozido-β-fructofuranozid, poate fi atacată la ambele capete. Glucozaharaza este o α-glicozidază care este inhibată de glucoză. Fructozaharaza este o β-glucozidază, inhibată de fructoză.

Fructozaharaza sau invertaza este o enzimă specifică pentru forma furanozică a fructozei, deoarece în zaharoză fructoza se găseşte în formă de furanoză, numită şi forma *h,* în care legătura glicozidică este β. Deaceea invertaza se mai numeşte şi β-*h*-fructozidază.

Este foarte interesant că zaharoza poate fi scindată şi de altă enzimă, o α-glicozidază, ducând la aceleaşi produse ca şi sub acţiunea invertazei. Aceste două enzime lucrează în condiţii diferite : α-glicozidaza are activitatea optimă la pH = 7, deci la neutralitate, pe când invertaza la pH = 4,5 deci în mediu acid, unde activitatea α-glicozidazei e aproape inexistentă.

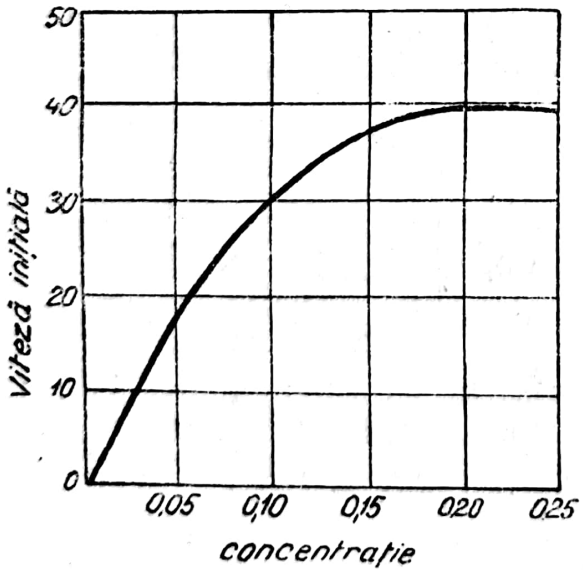


Fig. 75. Viteza iniţială a hidrolizei zaharozei de către β-fructozidaza (invertaza) în funcţie de concentraţia în zaharoză.

Faptul că zaharoza poate fi scindată de două enzime deosebite se explică prin aceea că cele două legături glicozidice care compun legătura dicarbonilică necesită fiecare o enzimă specifică : α-glicozidaza acţionează asupra legăturii glicozidice a moleculei de glucoză, invertaza β-glicozidaza asupra legăturii glicozidice a fructozei. Ambele hidrolaze duc la o moleculă de glucoză şi una de fructoză, cele două componente ale moleculei de zaharoză.

Acţiunea acestor enzime este un caz tipic de specificitate faţă de *izomeria inelului,* existentă în cele două molecule componente. Această specificitate apare clar în faptul că fructozaharoza atacă trizaharidul rafinoză (β-fructofu-

ranidozo $\begin{matrix}\uparrow\\\downarrow\end{matrix}$ α-glicozido-6-α galactozid), pe când glucozaharoza nu o atacă.

Invertaza se găseşte în sucul intestinal, nu se găseşte în sucul pancreatic, salivă, plasma sanguină. Se găseşte în drojdia de bere, alături de α-glicozidază, de unde au putut fi separate (1932).

ENZIMELE CARE SCINDEAZĂ LEGATURA —C—N—

I. Amidazele

1. **Ureaza** este *enzima care catalizează transformarea ureei în amoniac şi acid carbonic.* Se găseşte în special în boabe (bobul de soia), în ciupercile inferioare, în mici cantităţi în membrana stomacală, în vreo 200 de specii bacteriene.

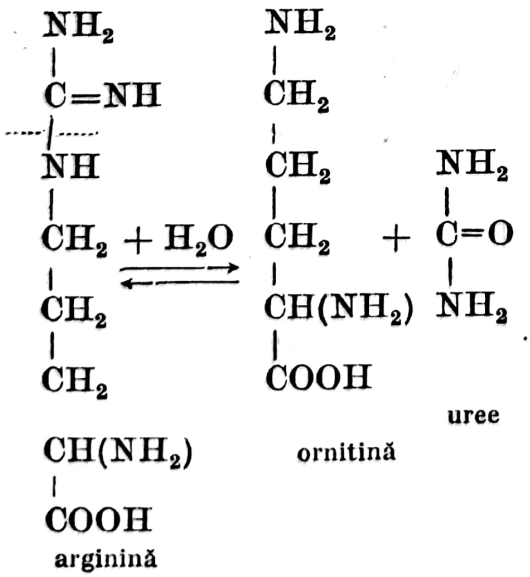
In organismul animal nu e importantă, deoarece ureea este un produs de eliminare, iar sinteza ei se face prin alt mecanism decât cu ajutorul ureazei. Pentru plante este însă o enzimă importantă. *Este prima enzimă obţinută sub forma cristalizată,* din extractul acetonic al făinii Jack (fig. 76). Are pH-ul optim de acţiune 7,3—7,5, dar acest pH optim e în funcţie de concentraţia substratului. Are o greutate moleculară de 483 000. Este o enzimă strict specifică, lucrează numai asupra ureei. Este inhibată de concentraţiile mari ale substratului său. Adăugarea de glicocol înlătură această inhibare (fig. 77).

Pentru activarea ei e necesară prezenţa grupărilor — SH — . E inactivată de ionii Cu şi, în genere, de metalele grele. Activitatea sa este în funcţie de potenţialul de oxidoreducere, etc.

E maximă la Eh = + 150 milivolţi, deci la un Eh mijlociu.

Se utilizează ureaza în metoda de determinare a ureei în sânge şi urină, numită metoda cu urează.

2. **Arginaza** catalizează scindarea aminoacidului arginina în ornitină şi uree,



reacţie foarte importantă, deoarece constitue una din etapele

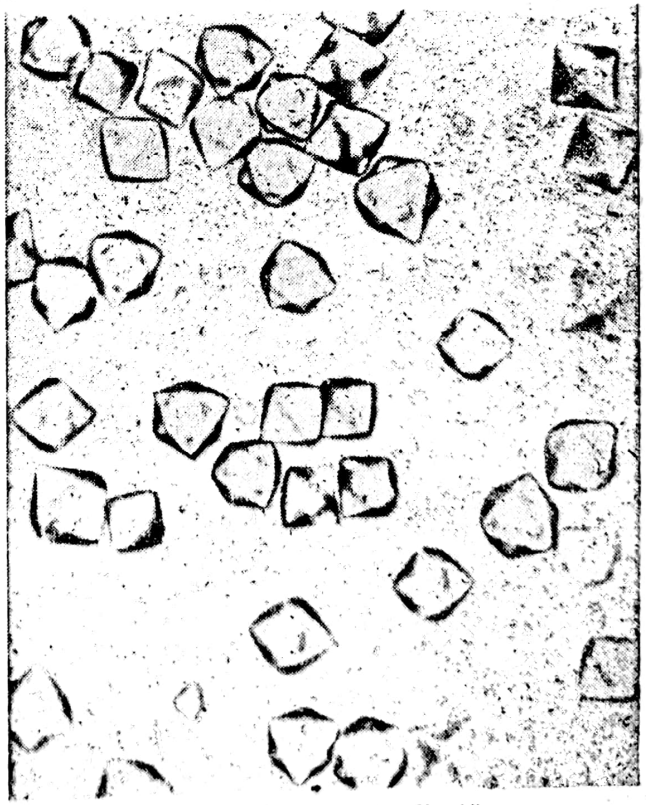


Fig. 76. Ureaza cristalizată

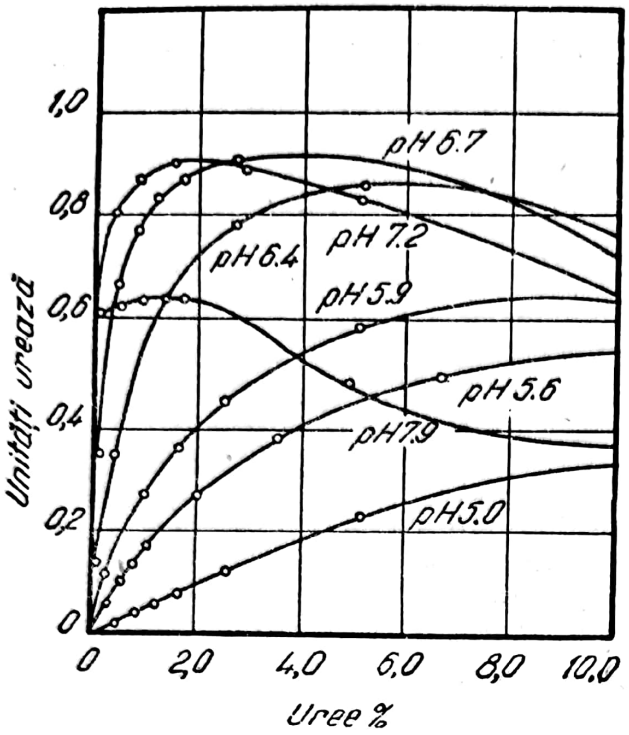


Fig. 77. Influența concentrației ureei asupra activității ureazei la diferite valori de pH

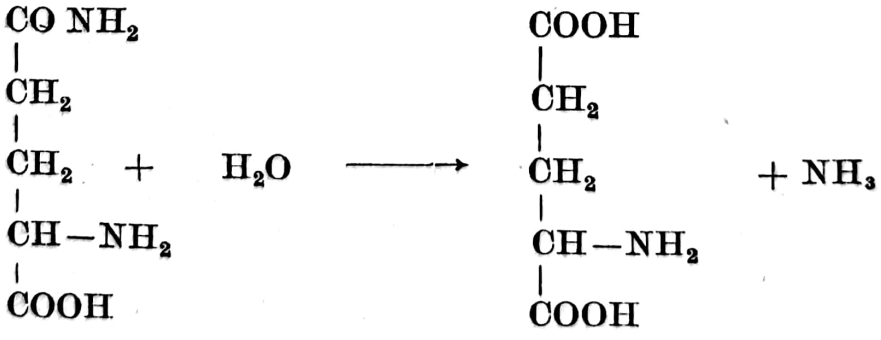
sintezei ureei în organism. Se găsește în mare cantitate în ficatul mamiferelor, locul de formare al ureei în organism, la unele microorganisme (*B. anthracis, pseudoanthracis,* stafilococi). Ar avea o mare specificitate stereochimică. Ar lucra numai asupra *l*-argininei, nu și asupra *d*-argininei. Arginaza bacteriană lucrează însă aproape egal de intens asupra *d* — și *l*-argininei.

In ficat, arginaza scindează arginina în uree și ornitină, apoi ornitina e transformată în citrulină prin adițiunea unei molecule de amoniac și a uneia de CO_2. Citrulina e transformată în arginină prin adăugarea unei molecule de amoniac și acțiunea arginazei reîncepe. Arginaza e inhibată de ornitină, dar nu de uree, ceeace ar indica formarea unui complex cu ornitina.

E posibil ca arginaza să aibă și un rol important în fenomenele de creștere, deoarece substratul său, arginina, se găsește în mare cantitate în proteinele din nuclei, (protamine și histone). E activată de ionii Mn, Co, inhibată de ionii Ag, borat, citrat.

3. **Asparaginaza,** scindează asparagina în acid asparagic și amoniac. Se găsește în intestin și în ficat.

4. **Glutaminaza** este o enzimă care se găsește în țesuturile animale și scindează glutamina în acid glutamic și amoniac (vezi formulele) :



glutamină — acid glutamic

Aceste două enzime catalizează hidroliza amidelor în acizii dicarboxilici corespunzători.

5. **Adenaza** şi 6. **guanaza** catalizează scindarea hidrolitică a adeninei cu formarea de hipoxantină, respectiv xantină. Sunt prezente în ficatul mamiferelor. Ele sunt purindesamidaze şi intervin desaminând bazele purinice din acizii nucleici înainte de a se face hidroliza la acidul uric.

7. **Hipuraza (histocim) sau hipuricaza** catalizează formarea acidului hipuric din acid benzoic şi glicocol în rinichi, având rolul de a realiza astfel eliminarea compuşilor toxici din organism, ca de exemplu acidul benzoic. Are deci acţiune desintoxicantă.

$$\underset{\text{acid hipuric}}{C_6H_5-CO-NH-CH_2-COOH} + H_2O = \underset{\text{acid benzoic}}{C_6H_5COOH} + \underset{\text{glicocol}}{H_2N\,CH_2-COOH}$$

8. **Transaminazele** (aminoferazele) au un rol foarte important în metabolismul aminoacizilor prin transferul grupării aminice de pe acidul glutamic sau aspartic pe acizii cetonici cu formare de noi aminoacizi; fac astfel parte de fapt din grupa enzimelor care catalizează reacţiile de transfer de grupări, din grupa ferazelor. Cercetătorii sovietici Braunştain şi Criţman au pus în evidenţă aceste enzime de transfer de mare importanţă în metabolismul aminoacizilor şi al proteinelor. Glutamic-transaminaza este foarte răspândită în ţesuturile animale; aspartic-transaminaza în special la plante. Vom vedea la metabolismul diaminoacizilor mecanismul lor de acţiune. Lucrări recente au arătat că vitamina B_6 (fosfopiridoxalul) ar fi un participant al acestor enzime.

Vom reveni asupra acestor enzime importante la capitolul metabolismului aminoacizilor, metabolism în care au un rol foarte important.

II. Proteazele

Proteazele sau enzimele proteolitice sunt, ca şi amidazele, enzime care scindează legăturile — C — N —.

Cuprind toate enzimele care catalizează scindarea proteinelor până la aminoacizi. Scindează legăturile peptidice cu fixarea elementelor apei H şi OH la produsele de scindare, eliberând grupările — COOH şi — NH_2. Acţiunea lor enzimatică poate fi astfel urmărită prin dozarea acestor grupări eliberate.

Până în ultimii ani, proteazele erau împărţite în două grupe mari: a) *proteinazele* şi b) *peptidazele*, după mărimea moleculei asupra căreia lucrează. Cercetări recente au arătat că această acţiune nu este în funcţie de mărimea moleculei, ci de un anumit tip de legături peptidice, lucru pus în evidenţă cu ajutorul peptidelor preparate sintetic.

A. Proteinazele

Proteinazele sunt enzimele care hidrolizează proteinele native cu moleculă mare, acţionând asupra legăturilor peptidice mai distanţate de grupările terminale ale catenei peptidice; deaceea se mai numesc şi endopeptidaze. Ele scindează moleculele mari proteinice în molecule mai mici, cu eliberarea unei cantităţi mici de aminoacizi. In această clasă sunt

Scanned with OKEN Scanner

cuprinse următoarele grupe de enzime: 1) *pepsinazele*; 2) *triptazele*; 3) *papainazele*.

Vom vorbi mai în detaliu despre fiecare din ele. Cercetările din ultimii ani, care au făcut posibilă sinteza a diverse peptide (Bergmann), precum şi obţinerea enzimelor sub forma lor cristalizată şi de purificare avansată, au permis studiul mai adânc al mecanismului de acţiune al acestor enzime şi au adus o interpretare nouă a acestui mecanism.

1. **Pepsinazele. Pepsina.** Din grupa pepsinazelor face parte pepsina. Este singura enzimă proteolitică din sucul gastric. Ea realizează primul atac al proteinelor, iniţiind astfel digestia lor. Pepsina e secretată sub forma sa inactivă de *pepsinogen* (zimogenul pepsinei) în regiunea prepilorică şi pilorică de către mucoasa stomacului. E produsă în special de celulele fundice (de celulele centrale). Celulele parietale din porţiunea pilorică a stomacului secretă acidul clorhidric care transformă printr'o acţiune catalitică pepsinogenul inactiv în pepsină activă. Pepsina astfel formată catalizează mai departe transformarea pepsinogenului în pepsină printr'un proces autocatalitic. In acest proces are probabil loc eliminarea unui inhibitor conţinut în pepsinogen (Herriot). Intr'adevăr, prin tratarea pepsinogenului în mediu acid cu un fragment de pepsină activă are loc o transformare a acestuia în pepsină (proces autocatalitic). Viteza de transformare e maximă la pH = 1, dar are loc şi la valori de pH sub 6. Pepsinogenul e rezistent la alcali slabi, spre deosebire de pepsină. Atât pepsina, cât şi pepsinogenul au fost obţinute sub formă cristalizată (fig. 78). Pepsinogenul cristalizat are o greutate moleculară de 42 000, iar pepsina cristalizată de 37 000. Trecerea dela forma inactivă de proenzimă la forma activă este deci întovărăşită de o scădere a greutăţii moleculare şi se poate presupune că a avut loc îndepărtarea unui inhibitor specific (Fig. 79). Are punctul izoelectric la pH = 2,7 (Northrop). Pepsina cristalizată are caracterul unei proteine, şi anume, al unei globuline. Conţine puţine grupări aminice (bazice), ceeace explică punctul izoelectric atât de acid. Conţine în molecula sa o moleculă de acid fosforic, doi atomi de clor şi 10 atomi de sulf. Nu s'a reuşit separarea unei coenzime şi apoenzime din complexul său enzimatic. Se atribue ionilor H^+ rol de coenzimă. Pentru a urmări care este componenta enzimatic activă din molecula pepsinei s'au făcut succesiv blocări ale diverselor funcţii din moleculă; astfel, blocând gruparea NH_2 prin acetilare cu ketene nu se modifică activitatea enzimatică. Acetilarea grupării OH duce numai la o încetinire a activităţii enzimatice; eliminarea aceti-

Fig. 78. Cristale de pepsină (x 34)

lării prin HCl regenerează acţiunea enzimatică. Orice acţiune de modificare a nucleului fenolic distruge însă activitatea enzimatică, deci aceasta este condiţionată de grupările fenolice libere.

Pepsina e activă numai în mediu puternic acid, optimul de activitate: pH = 1,5 — 2. Acţionează asupra proteinelor sub forma lor de cationi şi, în aceste limite, activitatea e în funcţie de pH-ul izoelectric al proteinei-substrat. La pH = 6—8, pepsina e inactivată în mod reversibil;

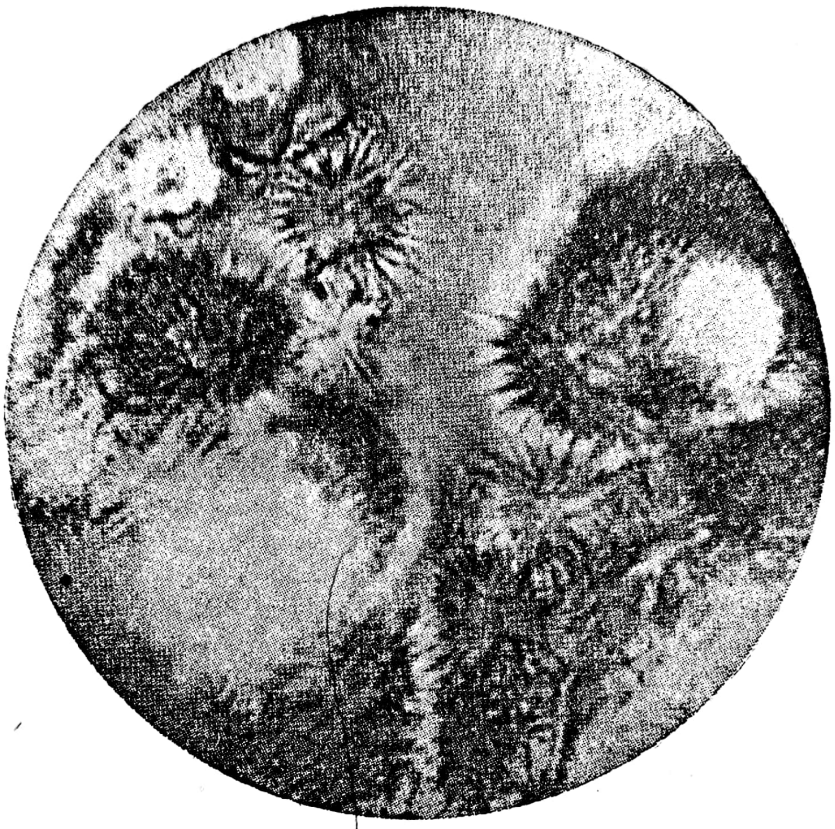
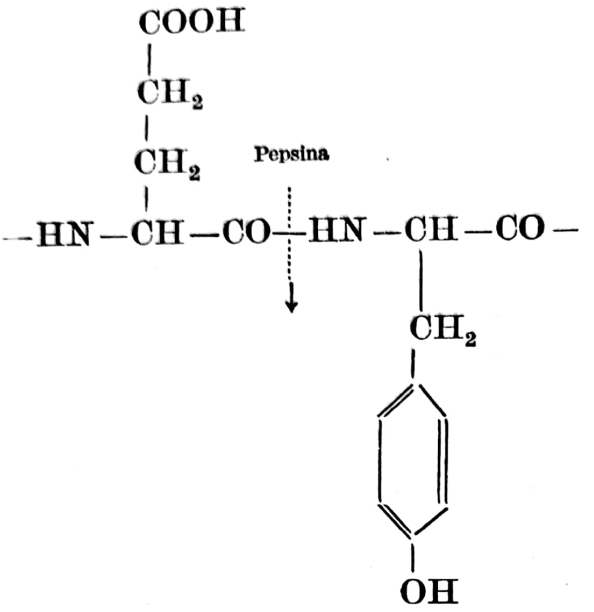


Fig. 79. Cristale de inhibitor al pepsinei (× 1590)

readusă în mediu acid îşi recapătă activitatea. Pepsina lucrează asupra tuturor proteinelor native. Catalizează hidroliza legăturilor peptidice, dar această acţiune nu depăşeşte 10—30% din aceste legături. Acest lucru s'a dedus din determinarea grupărilor $-NH_2$ şi — COOH eliberate. Produsele de scindare rezultate din acţiunea proteolitică a pepsinei sunt în genere proteoze şi peptone şi extrem de mici cantităţi de aminoacizi liberi.

Pepsina acţionează numai asupra legăturilor peptidice de un anumit tip, şi anume, atacă legătura peptidică care există între un acid L — dicarboxilic şi un aminoacid L-aromatic. Scindează numai legătura peptidică ce implică gruparea NH_2 a aminoacidului aromatic şi aceasta numai atunci când a doua grupare carboxilică a aminoacidului dicarboxilic este liberă şi în imediata vecinătate a legăturii peptidice. Pepsina poate ataca deci legătura peptidică formată între gruparea α-carboxilică a unui aminoacid dicarboxilic şi radicalul α-aminic al unui aminoacid aromatic, *l*-tirozina sau *l*-fenilamina, necesitând în acelaş timp ca a doua grupare carboxilică a acidului dicarboxilic să fie liberă; când există alăturat

o grupare aminică liberă, acțiunea enzimei este inhibată. Legătura scindată de pepsină este redată în formula :



Pepsina atacă numai această legătură peptidică și numai la L-aminoacizi, nu și aminoacizii din seria D.

Substratele care conțin ambele grupări carboxilice libere sunt cele mai ușor scindate ; amidificarea unuia din ele inhibă mult hidroliza peptică, iar blocarea ambelor grupări carboxilice o înlătură total. Pepsina atacă molecula mare, scindând probabil unul după altul fragmente mici, în funcție de proteină substrat, în medie hepta, sau octapeptide — care nu mai suferă hidroliză ulterioară.

Chimozina sau rennina (cu doi *n*, spre deosebire de cealaltă enzimă, renina, scrisă cu un singur n, cu rol hipertensiv) este enzima care se găsește în sucul gastric din al patrulea stomac la viței tineri și care are rolul să transforme cazeina în paracazeină, respectiv laptele din stare de sol în stare de gel (sarea de calciu a acesteia fiind insolubilă). Pepsina îndeplinește la om și celelalte animale acest rol și există o controversă dacă rennina și pepsina sunt două enzime diferite. Școala lui Pavlov susține însă că pepsina ar poseda în mediu puternic acid o acțiune digestivă, iar în mediu slab acid acțiune de coagulare. Rennina a fost obținută sub formă cristalizată ; are un pH optim de aproximativ 3,7.

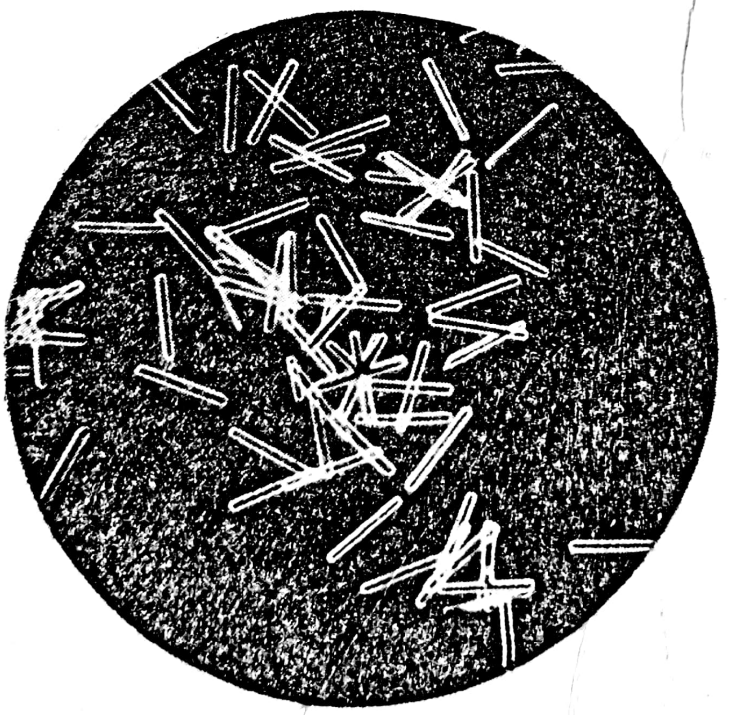


Fig. 80. Cristale de tripsină (×202)

2. **Triptazele.** In această grupă a enzimelor proteolitice intră *tripsina*. pH-ul său optim de activitate = 8. Își exercită deci acțiunea sa catalitică asupra proteinelor sub forma lor de anioni. Poate hidroliza proteinele native, dar mai intens pe cele denaturate (albumine, globuline, cazeina) și proteinele mai simple, histone și protamine, dar nu peptone și peptide. In organism își exercită acțiunea sa catalitică de degradare a proteinelor în sucul pancreatic. E produsă de pancreas sub forma sa inactivă, tripsinogenul, care e transformat în trip-

sină după ce vine în contact cu o enterokinază, o substanță activantă secretată de mucoasa intestinală și în special de cea duodenală (numele de enterokinază a fost dat de Pavlov).

Se admite că tripsinogenul e activat de enterokinază în tripsina activă, iar urmele de tripsină, printr'o acțiune catalitică, pot transforma mai departe tripsinogenul în tripsină activă (la pH 7—9). Transformarea tripsinogenului în tripsină nu produce o modificare a greutății moleculare ca în cazul transformării pepsinogenului în pepsină. S'a reușit să se obțină atât tripsina, cât și tripsinogenul sub formă cristalizată și este interesant de notat că tripsina cristalizată e activă ca atare fără a mai fi necesară acțiunea activantă a enterokinazei. Cristalele de tripsină (fig. 80), i cele de tripsinogen (fig. 81) sunt diferite. Tripsinogenul cristalizat poate fi activat sub acțiunea sulfatului de magneziu la pH = 7—8. Prin acțiunea tripsinei se desfac cam 50% din legăturile peptidice. Produsele de hidroliză sunt peptidele (nu produce scindarea până la aminoacizi); nu e enzimă de prim atac, deoarece nu hidrolizează proteinele native. Tripsina poate acționa asupra legăturilor peptidice adiacente unei grupări lizină sau arginină, deci unui aminoacid bazic. Gruparea aminică a acestor aminoacizi bibazici trebue să fie nesubstituită:

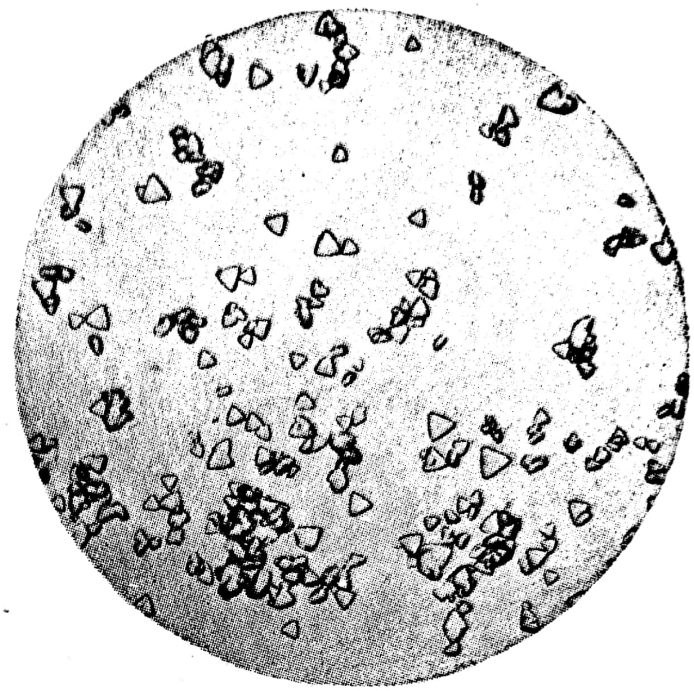
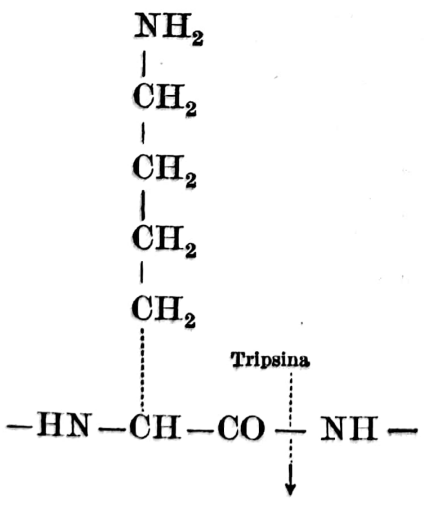


Fig. 81. Cristale de tripsinogen (×220)



Este inhibată de radicalul α-amino și de radicalii carboxilici. *Chimotripsina* și *chimotripsinogenul* sunt enzima și zimogenul său, care s'au izolat tot din pancreas și sucul pancreatic; catalizează hidroliza diverselor produse de digestie care au rezultat din prealabila acțiune a pepsinei și simultana acțiune a tripsinei. Produsele formate sunt polipeptide și aminoacizi; chimotripsina are cam o treime din acțiunea tripsinei, deși realizează digerarea cazeinei mai rapid. Chimotripsinogenul (fig. 82) e transformat în chimotripsină activă (fig. 83) sub acțiunea urmelor de tripsină și a urmelor de chimotripsină printr'un proces tocauatalitic. Au fost preparate sub forma cristalizată. Se cunoaște o α, β și γ-chimotripsină, (fig. 84) identice ca acțiune, dar diferite ca greutate moleculară. Chimotripsina ca și pepsina atacă legăturile

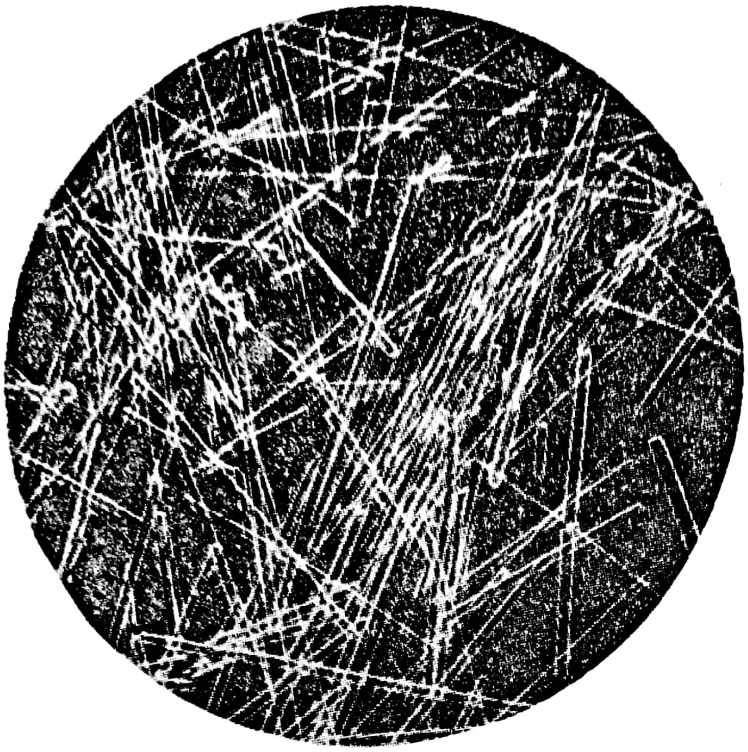
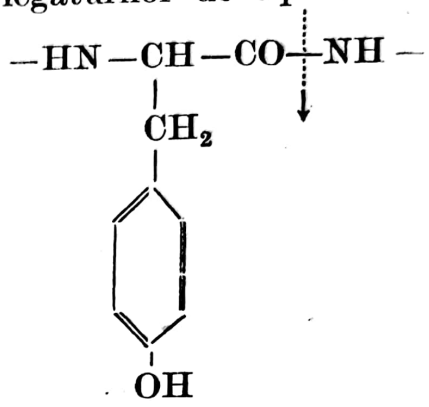
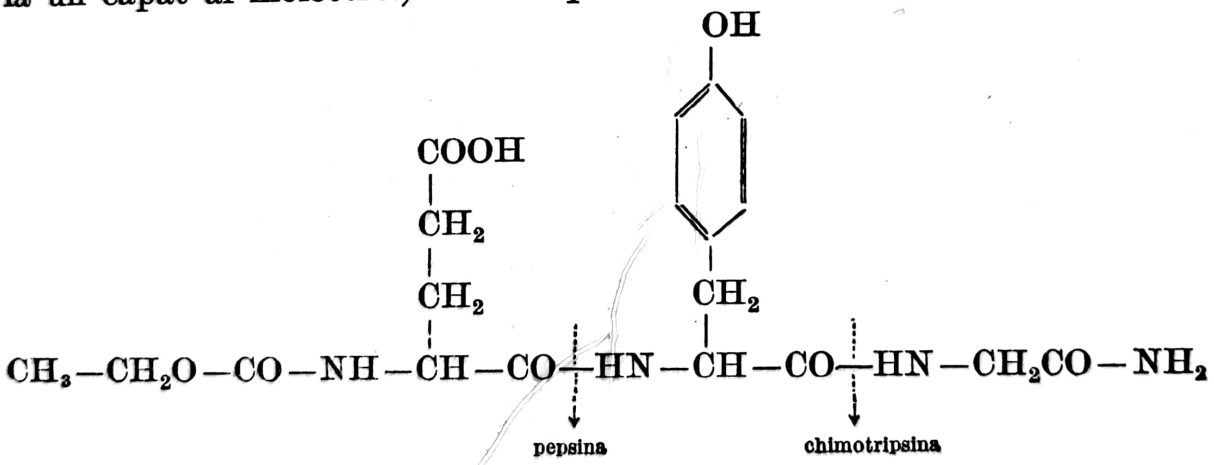


Fig. 82. Cristale de chimotripsinogen (×260)

peptidice în care sunt implicați aminoacizi aromatici, dar se deosebește de aceasta prin faptul că atacă legătura din partea carboxilică a moleculei. Este inhibată când radicalul carboxilic este liber. Schematic, acțiunea chimotripsinei se exercită asupra legăturilor de tipul:



Atacă această legătură la mijlocul grupării carboxil a acidului aromatic. Este inhibată de gruparea — COOH. Atât pepsina cât și chimotripsina atacă aceeași compuși, dar la puncte diferite de legătură. Astfel ele pot acționa asupra aceluiași peptid: carbobenzoxi-*l*-glutamil-*l*-tirozil-*l*-glicinamida, dar pepsina la un capăt al moleculei, chimotripsina la celălalt:



3. **Papainazele** sau **catepsinele** sunt proteinazele din țesuturi, sunt enzimele intracelulare, papainazele în celulele *vegetale*, catepsinele în cele *animale*. Papaina a fost extrasă întâi din planta sud-americană *Carica papaya*, catepsina din ficat și din rinichi. Au același mod de acțiune. Au zona de activitate la un pH 4—5, deci au acțiunea asupra proteinelor în zona lor izoelectrică, unde nu se găsesc sub forma de anioni sau cationi, ci sub forma de ioni neutri. Ele hidrolizează proteinele, proteozele și peptonele. Intervin în procesele de autoliză și autodigerare a țesuturilor. Sunt activate de gruparea —SH, glutationul H_2S, CNH. Sunt inhibate

de metalele grele Fe, Cu, dar pot fi reactivate de cianuri, cisteină, glutation, etc.

Studii recente (Bergmann) au arătat componenţa catepsinei renale şi splenice; acestea ar cuprinde patru componente cu specificităţi diferite.

Catepsina I homospecifică cu pepsina; catepsina II cu tripsina, III şi IV cu aminopeptidazele, respectiv carboxipeptidazele.

Fig. 83. Cristale de chimotripsină (×120)

Catepsina hidrolizează cel mai bine la pH 4—5 şi nu are acţiune în punctul neutru. E probabil că, deşi există în ţesuturi, e inactivă acolo, deoarece în timpul vieţii ţesuturile au un pH nefavorabil acţiunii ei. După moarte, ţesuturile devin acide (formare de acid lactic, etc.) şi catepsina poate intra în acţiune. Intervine astfel în procesele de autoliză şi autodigerare. Este însă probabil că are un rol important în sinteza proteinelor tisulare. In vitro s'a reuşit într'adevăr să se realizeze sinteza unor peptide cu ajutorul enzimelor proteolitice. In celule, enzimele pot să se reconstitue din resturile peptidice ale proteinelor constitutive, enzimele acestea intracelulare menţinând echilibrul dinamic între proteinele tisulare şi produsele lor de degradare.

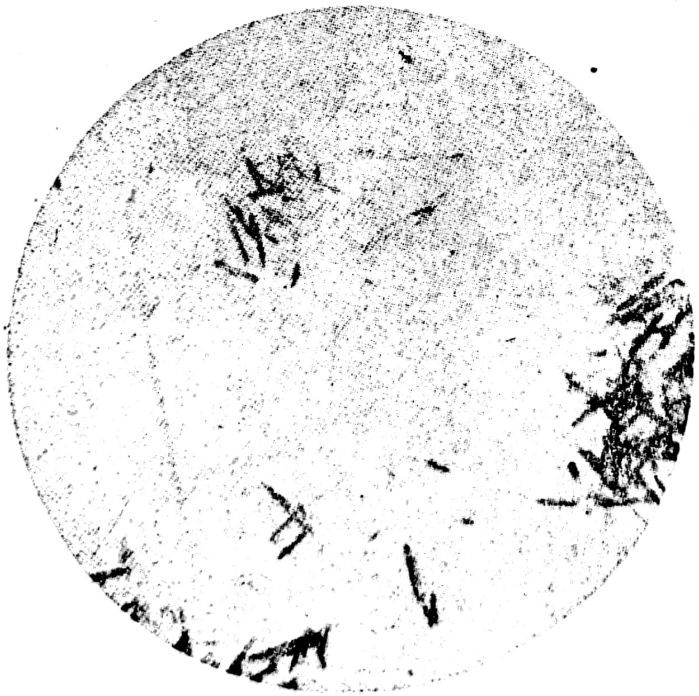


Fig. 84. Cristale de β-chimotripsină (×315)

Lucrări foarte interesante de sinteză a proteinelor au fost făcute la Institutul de Biochimie al Academiei de Ştiinţe din U.R.S.S. de C. Bressler şi I. V. Gilchin. Ei au experimentat sinteza enzimatică a polipeptidelor la presiuni de 5 000 atmosfere. Proteinele rezistă bine la aceste presiuni (sunt denaturate ireversibil abia între 15—20 000

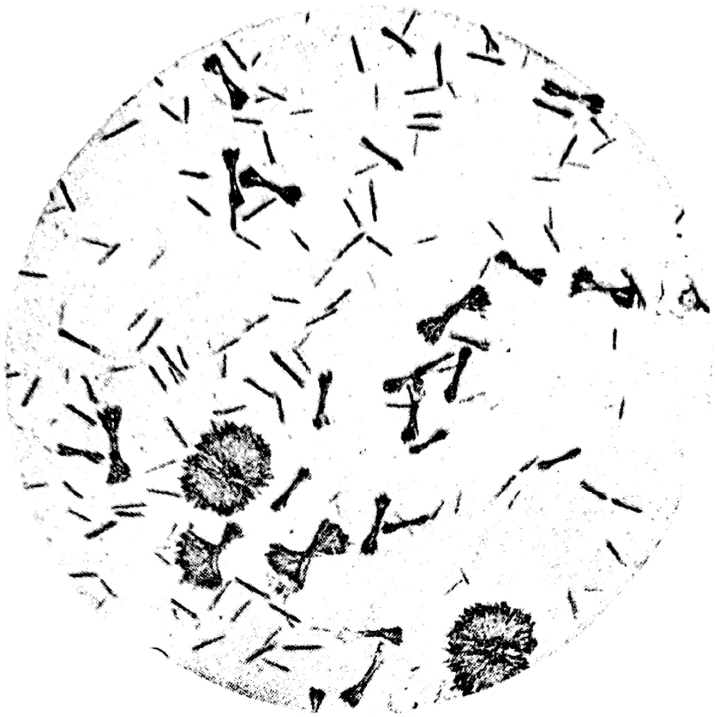


Fig. 85. Compusul tripsină — inhibitor din boabele de soia (×220)

atmosfere), care totuşi duc la o micşorare a volumului total al legăturilor dintre molecule şi la o polimerizare şi policondensare a lor. S'a lucrat cu gelatina hidrolizată în prezenţa pepsinei sau tripsinei. Produsele de hidroliză s'au supus în prezenţa enzimei unei presiuni de 5 000 atmosfere şi s'a obţinut un produs cu proprietăţi foarte asemănătoare ale produsului de plecare. Dacă după hidroliza enzimatică se distruge enzima printr'un mijloc oarecare şi ulterior se supune produsul de hidroliză presiunii înalte, resinteza nu se mai face; dacă se adaugă enzimă din nou, are loc resinteza, ceeace indică faptul că şi în sinteză a intervenit fenomenul enzimatic. S'a încercat astfel şi resinteza globulinei din ser.

B. **Peptidazele (erepsinele)**

Sunt enzimele care catalizează reacţiile de hidroliză ale *peptonelor* şi *peptidelor*. Peptidazele constitue o grupă de enzime care activează în sucul pancreatic şi intestine, grupă cunoscută demult sub numele de erepsine. Peptidazele lucrează asupra legăturilor peptidice terminale, cu eliberarea grupărilor de aminoacizi terminale. Se mai numesc după nomenclatura recentă (Bergmann) şi exopeptidaze.

Proteinele alimentare sunt hidrolizate iniţial de pepsina din sucul stomacal, apoi de tripsina din sucul pancreatic; produsele rezultate sunt atacate de erepsinele din sucul pancreatic şi intestinal. In grupa erepsinelor sau peptidazelor intră o serie de enzime, fiecare cu acţiune specifică în raport cu structura substratului. Sunt astfel:

1. **aminopolipeptidazele**, care scindează legătura peptidică, dar numai pe aceea vecină cu o grupare NH_2 liberă, nu şi pe aceea vecină cu o grupare carboxilică liberă

$$H_2N-CH-R-CO\,\vdots\,NH-CH-R-CO$$

2. **carboxipolipeptidazele** (fig. 86) desfac catenele terminale polipeptidice ale compuşilor cu o grupare COOH liberă (dar nu aceea cu gruparea NH_2 liberă), desfăcând câte un aminoacid:

$$....NH.CH-R-CO\,\vdots\,NH-CHR.COOH$$

3. **dipeptidazele** hidrolizează numai *dipeptidele*. In grupul acestora intră o serie de enzime cu acțiune specifică în raport cu aminoacizii pe care îi scindează, și anume :

— *prolinaza* scindează molecula de prolină din peptidele care o conțin având în același timp gruparea NH liberă ;

— *prolidaza* sau iminopeptidaza desface tot prolina din molecula peptidelor, dar numai atunci când gruparea NH e blocată într'o legătură peptidică.

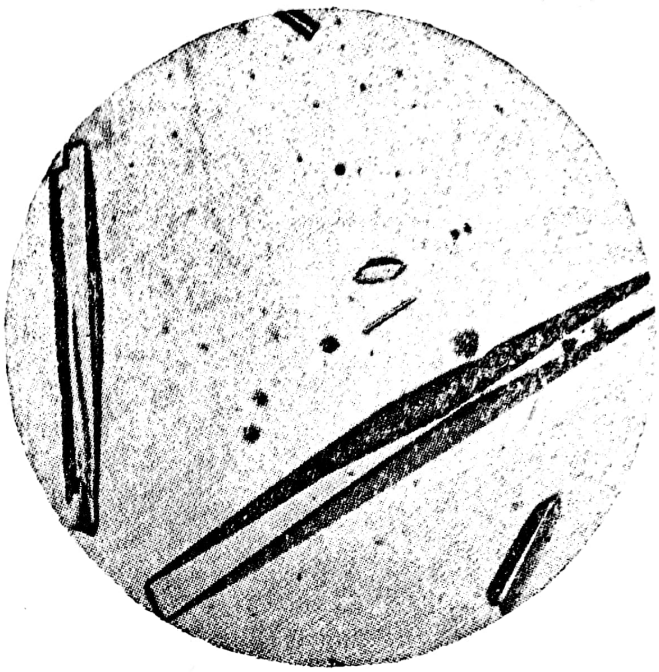
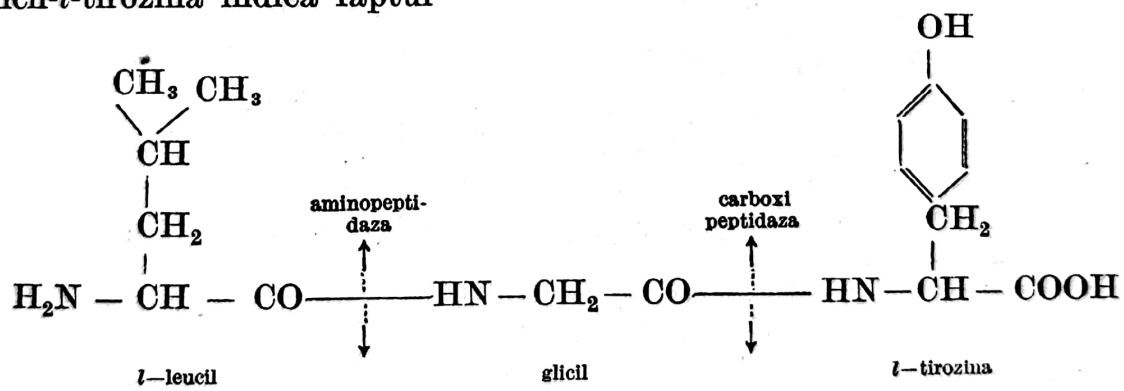


Fig. 86. Cristale de carboxipeptidază (×85)

Toate peptidazele lucrează între pH 7—9, deci în mediu alcalin. Din cercetarea acțiunii peptidazelor s'a constatat că au o mult mai mare specificitate decât proteinazele. Toate scindează legătura peptidică — CO—NH dar scindarea e îngrădită, condiționată de grupările COOH sau NH din vecinătatea legăturii peptidice și de prezența unor anumiți aminoacizi în moleculă.

Acțiunea acestor enzime, controlată asupra unui tripeptid *l*-leucil-glicil-*l*-tirozina indică faptul



că carboxipeptidaza eliberează gruparea tirozinică, iar aminopeptidaza, gruparea leucinică. Carboxipeptidaza nu poate acționa dacă în vecinătate există o grupare aminică liberă. Niciuna din aceste enzime, deci, nu va putea scinda mai departe dipeptidele rezultate din acțiunea izolată a uneia din ele. Acestea sunt hidrolizate de către dipeptidaze. Este probabil că există dipeptidaze specifice diverșilor aminoacizi din molecula dipeptidului.

Toate enzimele proteolitice acționează numai asupra legăturilor peptidice ale *l*-aminoacizilor.

Renina e o proteoză produsă de rinichi, care ar avea drept substrat o pseudoglobulină din ser. Este o enzimă nedializabilă, termolabilă distrusă peste 56°C.

Scanned with OKEN Scanner

Renina animală este inactivă la om; renina preparată din rinichiul uman exercită o acţiune hipertensivă la om.

Renina s'a găsit în circulaţia pacienţilor hipertensivi şi la acei intoxicaţi cu barbiturate.

Sângele sau plasma conţin o componentă activatoare a reninei, numită hipertensinogen — astfel că un preparat de renină foarte purificat inactiv ca atare, îşi recapătă proprietăţile vasoconstrictoare după adăugare de plasmă, sânge sau globulină serică.

Substanţa constrictoare însăşi, adică produsul acţiunei reninei asupra serum globulinei a fost numit „angiotonina" sau „hipertensina". Aceasta este un polipeptid (greutate moleculară mică, 2 700) cu rol în creşterea tensiunii arteriale, care împreună cu o altă enzimă din rinichi intervine în reglarea tensiunii arteriale. In compoziţia angiotoninei intră 27% histidină şi cantităţi mici de lisină, glicocol, alanină, serină, prolină, valină, leucină, tirosină, acid aspartic şi glutamic. Angiotonina nu este specie specifică; preparate obţinute din rinichiul animal produc efect presor la om şi la toate speciile cercetate. 1 mg preparat purificat are o acţiune hipertensivă egală cu 39 mg de fosfat de tiramină —are deci o capacitate de creştere a tensiunii egală cu aceea a adrenalinei. Acţionează direct asupra musculaturii vasculare şi stimulează aproape toţi muşchii netezi. Reduce circulaţia renală probabil prin constricţia arteriolelor glomerulare aferente. Presiunea arterială este astfel crescută şi proporţia de lichid filtrat din plasmă este crescută.

Mecanismul renină — hipertensină se poate rezuma astfel:

Renina (Enzima eliberată de cortexul renal) + Hipertensinogen (Pseudoglobulina de origine hepatică) (precursorul angiotoninei) ——→

——→ Hipertensina (angiotonina) (vasoconstrictor activ) + Hipertensinaza (angiotonaza) (formată în rinichiul normal) ——→

——→ inactivare.

Ar mai exista şi o altă enzimă, *angiotonaza* sau hipertensinaza, care ar inactiva angiotonina sau hipertensina. Aceasta s'ar găsi în fracţiunea albuminică din plasmă; este factorul activ din ţesutul renal normal care acţionează în cazurile de hipertensiune renală severă. Hipertensinaza se găseşte şi în mucoasa intestinală, în pancreas, globulul roşu, ficat, în ser. Are pH optim 7,5—8,5. Substanţa hipertensivă ar lucra direct asupra vaselor.

Inainte de a termina capitolul enzimelor proteolitice, vom face câteva consideraţii generale asupra acţiunii acestora în organism, această acţiune fiind un exemplu de colaborare a diverselor enzime pentru a se ajunge la produsele finale de degradare ale metabolitelor.

Hidroliza totală a proteinelor alimentare se face sub acţiunea enzimatică asociată a sucului gastric, pancreatic şi intestinal. Sucul pancreatic conţine enzimele sub formă inactivă, sub formă de zimogene. Aceste zimogene sunt transformate în enzime active sub acţiunea sucului intestinal. Sucul pancreatic conţine iniţial precursorii enzimelor, iar sucul intestinal activatorii lor. Sucul pancreatic conţine zimogenele următoa-

Scanned with OKEN Scanner

relor enzime: ale proteinazelor triptice (tripsina); ale unei protaminaze, ale unei carboxipolipeptidaze. Acest complex era cunoscut înainte sub numele de tripsină, componentele lui nefiind identificate.

Sucul intestinal conţine şi el o serie de enzime ce complectează acţiunea enzimelor pancreatice, şi anume o aminopolipeptidază, o dipeptidază, o polipeptidază, deci un complex enzimatic care era cunoscut înainte sub numele de erepsină. Sucul intestinal nu conţine o proteinază, deaceea nu e activ faţă de proteine, ci numai faţă de produsele lor de scindare; conţine însă tocmai peptidazele care lipsesc din sucul pancreatic şi complectează astfel procesul de degradare al proteinelor. Acţiunea coroborată a sucului pancreatic şi intestinal se poate rezuma astfel: proteinazele din sucul pancreatic, activate, degradează proteinele la polipeptide, desfăcând legăturile peptidice. Carboxipeptidaza atacă peptidele cu gruparea carboxilică liberă şi elimină unul câte unul din aminoacizii din lanţul peptidic până se ajunge la un dipeptid, care e degradat la aminoacizi simpli de către dipeptidazele din sucul intestinal. Deci, sucul pancreatic şi cel intestinal, incomplecţi fiecare în parte din punct de vedere enzimatic, îşi combină acţiunea lor, ducând degradarea proteinelor complexe la componentele lor cele mai simple, la aminoacizi, singura formă sub care se poate face absorbţia lor în organism.

DESMOLAZELE — (SAU ENZIMELE DE OXIDOREDUCERE)

Desmolazele constitue a doua grupă mare de enzime, din care fac parte enzimele ce catalizează oxidoreducerile. Termenul „desmolază" defineşte o enzimă care scindează lanţul carbonic —C—C...

Cu ajutorul acestor enzime organismul realizează pe cale oxidativă degradarea substanţelor din alimentaţie, atât pe acelea care au fost folosite ca elemente plastice, cât şi pe acelea depozitate sub formă de rezerve. Energia potenţială din alimentele organice, eliberată în reacţiile de oxidoreducere, e utilizată în organism pentru acoperirea nevoilor sale fiziologice.

Enzimele de oxidoreducere se pot clasifica în următoarele grupe:

I grupa *dehidrazelor* sau *dehidrogenazelor,*

II grupa *oxidazelor,*

III *grupa enzimelor ajutătoare ale desmolizei.*

Inainte de a analiza enzimele din această grupă este necesară cunoaşterea mecanismului de oxidoreducere în genere, deoarece ele intervin direct în acest mecanism.

MECANISMUL OXIDOREDUCERILOR

Se definesc în chimia pură ca fenomene de oxidare trei grupe de reacţii, în aparenţă foarte deosebite:

1. oxidările prin *fixare de oxigen,* numite şi *oxigenări*;
2. oxidările prin *pierdere de hidrogen,* numite şi *dehidrogenări*;
3. oxidările prin creştere de valenţă, respectiv prin pierdere de electroni.

1. **Oxidarea prin fixare de oxigen** este mecanismul cel mai direct de oxidare, de unde şi denumirea de oxidare propriu zisă sau *oxigenare* (Connant). Exemple de asemenea oxidaţii:

a) arderea C în aer: $C + O \longrightarrow CO \xrightarrow{+O} CO_2$;

b) oxidarea metalelor în oxizii metalici corespunzători :

$$Cu + O \longrightarrow CuO;$$

c) transformarea Hb în oxihemoglobină : $Hb + O_2 \rightarrow HbO_2$;

d) transformarea unei hidrocarburi în alcool :

$$\underset{\text{etan}}{CH_3-CH_3} + O \longrightarrow \underset{\text{alcool etilic}}{CH_3-CH_2-OH};$$

e) formarea unei molecule de apă : $H_2 + 1/2O_2 \longrightarrow H_2O$.

2. **Oxidările prin pierdere de hidrogen** se mai numesc și *dehidrogenări* sau *deshidrogenări*.

Exemple : *a*) oxidarea unui alcool în aldehida corespunzătoare :

$$CH_3-CH_2OH \xrightarrow{-H_2} CH_3-\overset{\overset{O}{\|}}{C}H;$$

b) oxidarea unei hidrocarburi saturate în hidrocarbură nesaturată corespunzătoare :

$$\underset{\text{etan}}{CH_3-CH_3} \xrightarrow{-H_2} \underset{\text{etilen}}{CH_2=CH_2}$$

a unui acid saturat în acidul nesaturat corespunzător :

$$\begin{array}{l} COOH \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CH_2 \\ | \\ COOH \end{array} \xrightarrow{-H_2} \begin{array}{l} COOH \\ | \\ CH \\ \| \\ CH \\ | \\ COOH \end{array}$$

$$\underset{\text{acid succinic}}{} \xrightarrow{-H_2} \underset{\text{acid fumaric}}{}$$

c) *oxidarea hidrochinonei în chinonă* :

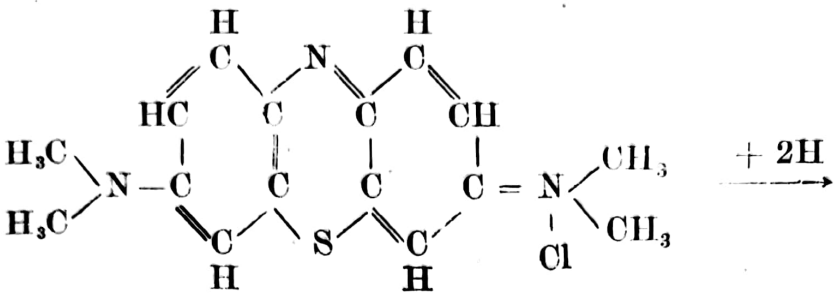
$$HO-C_6H_4-OH \xrightarrow{-H_2} O=C_6H_4=O$$

d) *oxidarea leucoalbastrului* de metilen (incolor) în albastru de metilen (colorat).

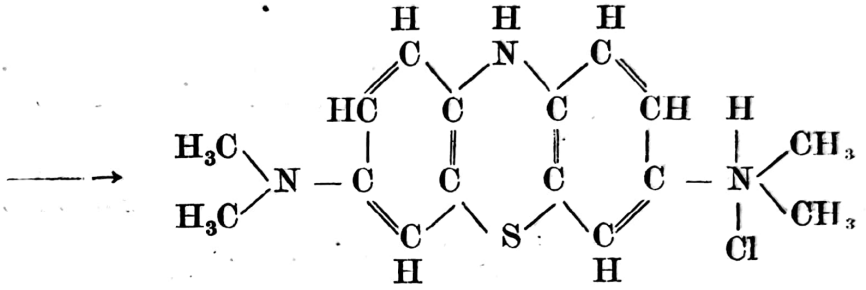
Dacă se ia leucoalbastru de metilen, forma incoloră a albastrului de metilen, și se agită în prezența aerului sau a oxigenului, se colorează în albastru. Dacă se face analiza chimică a produșilor incolor și colorat, se constată că acesta din urmă conține 2H mai puțin decât forma incoloră. In prezența O, forma incoloră pierde doi atomi de hidrogen și trece în forma colorată. A avut loc deci în acest caz o oxidare sub acțiunea *oxigenului*, dar nu cu fixarea acestuia, ci oxigenul a fixat hidrogenii scoși din molecula formei colorate a albastrului de metilen. A avut loc deci o dehidrogenare. Deoarece fixarea acestor hidrogeni poate fi făcută nu numai de oxigen, ci de oricare alt compus capabil de a-i primi, s'a extins noțiunea de oxidare la toate procesele chimice care se petrec cu eliberare de hidrogen, adică la toate procesele de dehidrogenare, hidrogenul eliberat

Scanned with OKEN Scanner

putând fi fixat sau de oxigen sau de orice alt compus chimic capabil de a fixa hidrogenul :



Albastru de metilen



Leucoalbastru de metilen

3. **Oxidările prin pierdere de electroni** duc la o transformare a compuşilor dela o stare de valenţă mai mică la o stare de valenţă mai mare.

Trecerea dela Fe^{++} la Fe^{+++},
dela Cu^{+} la Cu^{++}

sau dela o stare neionizată la o stare ionizată

$$Cu \xrightarrow{-e} Cu^{+}$$

$$Fe \xrightarrow{-2e} Fe^{++} \xrightarrow{-e} Fe^{+++}$$

Pentru a înţelege dece s'au înglobat reacţiile prin pierdere de electroni în reacţiile de oxidare, dăm exemplu tipic de oxidare a sulfatului feros în sulfat feric de către oxidantul permanganat de potasiu :

$$2\,Mn\,O_4K + 10\,SO_4Fe + 8\,SO_4H_2 \longrightarrow$$
$$\longrightarrow 2\,SO_4Mn + SO_4K_2 + 5\,[(SO_4)_3\,Fe_2] + 8\,H_2O$$

sau exprimat în ioni :

$$2\,Mn^{+++++++} + 10\,Fe^{++} \longrightarrow 2\,Mn^{++} + 10\,Fe^{+++}$$

(10 e)

Manganul e heptavalent în permanganatul de K; Fe este bivalent în sulfatul feros ; în prezenţa oxidantului, permanganat de K, Fe bivalent e oxidat în Fe trivalent : 10 ioni feroşi cedează împreună 10 electroni celor 2 ioni heptavalenţi manganici. 2×7 încărcări + ale ionilor permanganici sunt neutralizaţi de 10 electroni cedaţi de ionul feros Fe^{++}. Prin aceasta, ionul Fe^{++} trece în Fe^{+++}, iar ionul permanganic $Mn^{+++++++}$

Scanned with OKEN Scanner

trece în ion manganos bivalent Mn^{++}, care nu are decât două încărcări pozitive. In această reacţie, oxigenul din oxidant nu intervine direct pentru a transforma ionul Fe^{++} în ion Fe^{+++}.

Reacţiile de reducere

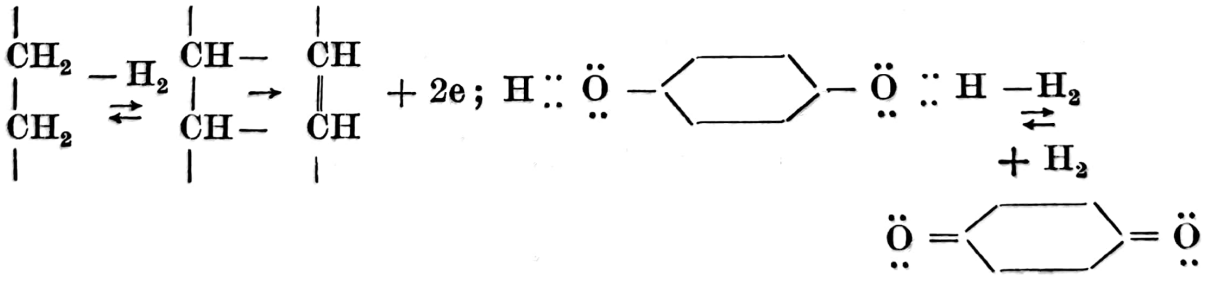
sunt reacţiile inverse oxidărilor şi se produc :

1. prin pierdere de oxigen sau desoxigenări,
2. prin fixare de hidrogen sau hidrogenări,
3. prin fixare de electroni sau scădere de valenţă.

Reunirea tuturor acestor fenomene în aparenţă disparate, sub aceeaşi denumire de fenomene de oxidoreducere, este perfect îndreptăţită, dacă se ia în seamă însuşi mecanismul reacţiilor pe baza teoriilor noi asupra structurii atomului. In toate cazurile înglobate sub numele de *„oxidări"*, fenomenul de bază este acelaş : *„eliminare de electroni"*. In toate cazurile înglobate sub numele de *„reduceri"*, fenomenul de bază este acelaş : *„fixare de electroni"*.

In oxidările prin fixare de oxigen, precum şi în acelea prin pierdere de hidrogen, mecanismul intim constă tot într'o eliberare de electroni, în mediul în care au loc oxidările.

Ca exemplu să luăm aşa zisele oxidări prin dehidrogenare, care au loc în trecerea dela etan la etilen sau dela hidrocarbură la chinonă. Atomii de carbon au 4 electroni de valenţă în etan ; aceştia îşi complectează octetul prin trei electroni aparţinând la trei atomi de hidrogen, iar al patrulea dela atomul de carbon vecin. Prin scoaterea a 2H, ceeace duce la trecerea dela etan la etilen, atomii de carbon pierd electronii de pe octetul lor, astfel că pătura lor periferică rămâne cu câte 7 electroni. Stabilirea unei duble legături între cei 2 atomi de carbon reface oarecum octetul, dar nu complect, ca şi cum aceşti carboni ar avea totuşi octetul incomplect, fapt care se manifestă prin aviditatea mare a compusului cu legătură dublă. Astfel, trecerea dela etan la etilen e aparent o oxidare prin pierdere de hidrogen, dar, prin mecanismul intim, este o oxidare prin pierdere de electroni. Acelaş lucru la trecerea hidrochinonei în chinonă, fenolului în cetonă :



Invers, reducerea chinonei la hidrochinonă constă într'o fixare a electronilor. Procesele de oxidare şi reducere sunt în genere reversibile. Mecanismul intim al oxidărilor corespunde unei pierderi de electroni de către substanţa care oxidează ; mecanismul reducerii constă într'o fixare de electroni de către substanţa care se reduce. Molecula care se oxidează cedează electronii săi altei molecule care, primind electronii, se reduce. Noţiunea de oxidant şi reductor este foarte relativă. Un corp *A* poate fi oxidant în raport cu un corp *B*, poate deci să i se fixeze electroni, el însuşi

reducându-se; poate fi reductor faţă de alt corp *C*, cedându-i acestuia electroni.

Oxidoreducerile se petrec deci, în ultimă analiză, printr'un transport de electroni care poate fi măsurat printr'un potenţial electric numit din acest motiv potenţial de oxidoreducere. Să vedem cum e definit acest potenţial şi care este semnificaţia lui.

Potenţialul de oxidoreducere

Potenţialul de oxidoreducere măsoară intensitatea de oxidare sau reducere a unui sistem dat. Exprimarea intensităţii de oxidoreducere printr'un potenţial electric apare posibilă dacă se ia în seamă însuşi mecanismul chimic al oxidării şi al reducerii. Procesul de oxidoreducere constând într'un transport de electroni de pe compusul care se oxidează pe compusul care se reduce, acest transport creează în sistem o diferenţă de potenţial electric, diferenţă care va fi cu atât mai mare cu cât corpul care se oxidează cedează mai uşor electronii săi şi cu cât corpul care se reduce îi acceptă mai cu uşurinţă. Valoarea numerică a potenţialului electric poate da astfel o măsură a capacităţii de oxidare şi reducere a unui sistem dat.

Calcularea potenţialului de oxidoreducere

Potenţialul de oxidoreducere se calculează cu formula lui Nernst dată pentru pilele de concentrare, deoarece un sistem oxidoreductor constitue de fapt un caz particular al unei pile de concentrare. Intr'adevăr, dacă avem două soluţii, una conţinând forma oxidată a unei molecule, de exemplu clorura ferică (Fe^{+++})şi alta forma de reducere, în speţă, clorura feroasă (Fe^{++}) şi punem aceste două soluţii în contact, separate printr'o membrană poroasă sau un capilar, introducând în fiecare soluţie câte un fir de platină legate între ele prin intermediul unui acumulator, se constată că între aceşti doi electrozi se stabileşte o diferenţă de potenţial *proporţională cu intensitatea* cu care electronii trec din soluţia care se oxidează în soluţia care se reduce (fig. 87). Acest potenţial măsoară astfel intensitatea de oxidoreducere a sistemului reversibil $Fe^{+++} \rightleftarrows Fe^{++}$ şi e o măsură a raportului dintre forma oxidată şi cea redusă din sistem. Dacă facem diverse amestecuri din forma oxidată şi cea redusă în proporţii diferite, potenţialul electric determinat va fi în funcţie de

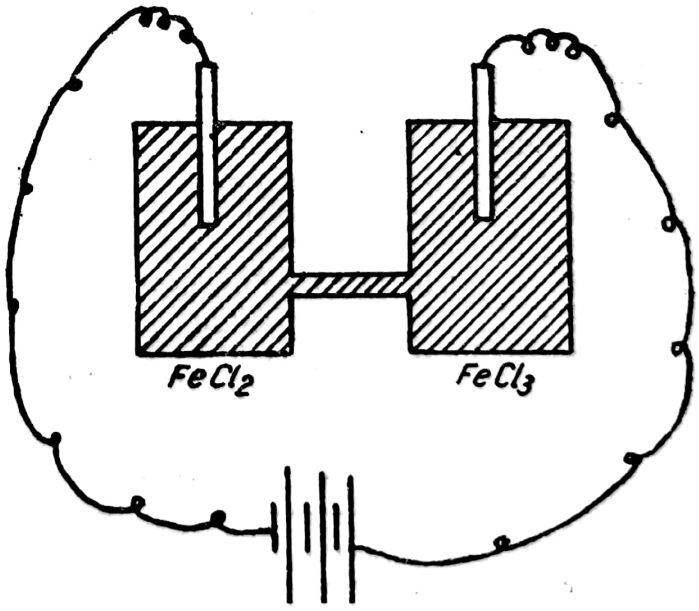


Fig. 87. Schimbul ionilor Fe.

raportul acestora în sistem, de raportul concentrației componentelor și va putea fi astfel calculat cu ajutorul formulei lui Nernst. $E_h = \frac{RT}{nF} \log \frac{C_{ox}}{C_{red}} + Eo$

unde R = constanta generală a gazelor;
T = temperatura absolută;
C_{ox} = conc. formei oxidate;
C_{red} = conc. formei reduse
n = valența (numărul de electroni care se elimină în oxidație)
F = Faraday (96 500 coulombi)
E_o = valoarea potențialului E în cazul special când $C_{ox} = C_{red}$, adică atunci când concentrația formei oxidate e egală cu concentrația formei reduse și deci: $\frac{RT}{nF} \log 1 = 0$.

E_0 se mai numește și potențial normal de oxidoreducere și este o constantă caracteristică fiecărui sistem oxidoreductor; se mai numește și potențial „redox normal" pentru un sistem dat și e în funcție numai de temperatura și pH-ul sistemului.

Valoarea potențialului de oxidoreducere se exprimă în volți sau fracțiuni de volți. In genere, mărimea acestui potențial în sistemele biologice e de ordinul milivolților. Un sistem având un potențial „redox normal" mai pozitiv decât alt sistem va putea primi electronii dela acesta din urmă — deci îl va oxida. Orice sistem cu valori pozitive mai mici decât ale altuia va reduce acest sistem, deci valoarea potențialului redox ne va indica dacă acest sistem, în contact cu alte sisteme oxidoreductoare, va putea fi oxidat sau redus. De exemplu, o soluție de fericianură de potasiu are un potențial redox normal egal cu + 0,785 volți. Ea va putea fi oxidată de soluțiile cu un potențial mai pozitiv, de exemplu, bicromatul de potasiu care are potențialul + 0,91 volți, iar aceasta la rândul ei de o soluție de iodat de potasiu cu un potențial de +1,21 volți. Reducerea se va putea face invers. Dacă punem împreună două sisteme reductoare A și B, A nu va putea reduce pe B decât dacă A are un potențial de oxidoreducere mai negativ decât B, adică dacă are o capacitate mai mică decât B de a emite electroni. Cu cât un sistem e mai reductor, cu atât valoarea potențialului său redox e mai negativă; cu cât un sistem e mai oxidant, cu atât valoarea potențialului său e mai pozitivă. Scara valorilor potențialelor redox a fost stabilită în raport cu potențialul redox al hidrogenului, recunoscut ca fiind redox-potențialul cel mai negativ pe care îl poate avea un sistem. Valorile redox ale tuturor sistemelor sunt deci relative și nu absolute, dar ele constitue o caracteristică a fiecărui sistem și permit să se precizeze poziția sa într'un lanț de reacții posibile. Dăm valoarea potențialului redox normal pentru câteva sisteme oxidoreductoare biologic importante, la pH = 7 și T = 37° (v. tabelul 14).

Tabelul 14

Potențialul de oxidoreducere al unor compuși biologici

Citocromul C = + 0,253 volți	Fermentul ⇄ Fermentul galben : —0,060 volți
Acidul ascorbic = +0,066 volți	galben redus oxidat
Acidul fumaric ⇄ Acid succinic : —0,011 volți	Cistina ⇄ Cisteina : —0,230 volți
Acid malic ⇄ Acid oxalacetic : —0,169 volți	Acid lactic ⇄ Acid piruvic : —0,200 volți

Scanned with OKEN Scanner

Aceste sisteme se ştie că intervin în oxidaţiile celulare şi cunoaşterea potenţialului lor redox a permis precizarea poziţiei lor în lanţul reacţiilor de oxidare şi reducere care au loc în celule. Fiecare sistem care în acest lanţ e mai pozitiv e un oxidant pentru cel următor şi un reductor pentru cel de dinaintea lui.

Metodele de determinare

Determinarea experimentală a potenţialului de oxidoreducere se poate face pe cale electrometrică şi pe cale colorimetrică.

1. **Metoda electrometrică** este cea mai precisă şi serveşte ca metodă de referenţă. In această metodă se foloseşte ca electrod o lamă sau un fir de platină ce se introduce în soluţia de cercetat. Se constată că platina capătă un potenţial anumit, în raport cu potenţialul de oxidoreducere al soluţiei şi se determină faţă de electrodul normal de hidrogen, respectiv faţă de electrodul de calomel — soluţie saturată de clorură de potasiu. Se lucrează în atmosferă lipsită de oxigen, în atmosferă de azot. Valoarea potenţialului se calculează cu ajutorul formulei lui Nernst.

Valorile potenţialului se exprimă în volţi; ele sunt în funcţie de pH-ul şi temperatura sistemului. Un sistem e oxidant faţă de alt sistem când are un potenţial de oxidoreducere mai pozitiv decât acesta, poate deci fixa cu mai multă uşurinţă electronii acestuia, care, pierzându-i, se oxidează.

Un sistem e reductor faţă de altul când cedează electronii săi acestuia, care, fixându-i, se reduce. Se poate stabili astfel pentru diversele sisteme oxidoreductoare o scară a valorilor potenţialelor redox normale. Fiecare sistem va fi oxidant faţă de sistemul de după el şi reductor faţă de sistemul de dinaintea lui.

Cu această metodă s'a stabilit un tabel al valorilor potenţialelor de oxidoreducere ale diverşilor coloranţi care au fost folosiţi ca indicatori de oxidoreducere în metoda colorimetrică de determinare a potenţialului redox (albastru de metilen + 11 milivolţi, roşu neutru — 340 milivolţi, indofenol + 248 milivolţi).

2. **Metoda colorimetrică** de determinare a potenţialului de oxidoreducere este bazată *pe proprietatea unei substanţe colorante de a avea o anumită culoare sub formă oxidată şi o altă culoare sau de a fi incolor sub forma sa redusă.*

Aceste substanţe, introduse într'un sistem capabil de a le oxida sau de a le reduce, îşi vor schimba culoarea, servind astfel drept indicator de oxidoreducere.

Dacă se cunoaşte potenţialul de oxidoreducere normal al colorantului, se va putea determina valoarea potenţialului unui sistem dat după modificarea de culoare pe care o va suferi primul dacă al doilea sistem are un potenţial mai pozitiv sau mai negativ decât al indicatorului.

Dacă un asemenea colorant e introdus sub forma sa redusă incoloră în ţesuturi sau chiar în interiorul unei celule, el va fi oxidat la forma sa colorată dacă potenţialul sistemului e mai pozitiv decât al colorantului. Tehnica de determinare colorimetrică a potenţialului de oxidoreducere e următoarea:

1. indicatorul e utilizat în genere sub forma sa oxidată (colorată);
2. se încearcă o serie de indicatori până se găseşte unul care introdus

în sistem suferă o modificare de culoare, dar nu merge până la decolorarea totală;

3. schimbarea de nuanță are loc în genere în momentul în care raportul dintre forma oxidată și cea redusă a indicatorului este de 1/1; aceasta corespunde potențialului normal de oxidoreducere al colorantului. Deci, soluția în care indicatorul își schimbă nuanța are ca valoare a potențialului său valoarea redox a potențialului indicatorului.

Noțiunea de rH

Am văzut că potențialul de oxidoreducere se exprimă în volți, în valori E_H.

După Clark, însă, se poate exprima și în așa numitele valori r_H, în care se ia în calcul și valoarea pH-ului sistemului oxidoreductor. Să vedem care este relația dintre rH și E_H și care este semnificația rH-ului.

Potențialul de oxidoreducere se determină în raport cu sistemul oxido-reductor standard constituit din „electrodul normal de hidrogen", adică un sistem în care presiunea hidrogenului gazos H_2 este egal cu o atmosferă, iar concentrația ionilor de (H^+) egală cu 1 (pH = O). Între H_2 molecular aflat la suprafața platinei platinate din acest electrod și concentrația (H^+) a ionilor de H din soluție este o relație reversibilă:

$$1/2\ H_2 \rightleftarrows H^+ + e^-$$

unde H_2 este forma redusă și H^+ forma oxidată a hidrogenului, acesta din urmă rezultând din primul prin pierdere de electron.

Potențialul de oxidoreducere al acestui sistem este dat de relația Nernst:

$$E_H = -\frac{RT}{nF}\log(H_2) + \frac{RT}{nF}\log(H^+)$$

$+\log(H^+) = -$ pH și dacă se pune prin analogie cu această relație după Clark $-\log(H^+) =$ rH., relația de mai sus devine:

$$E_H = \frac{RT}{nF}rH - \frac{RT}{nF}pH \qquad \begin{matrix} n^{\bullet}\text{ coresp. lui } H_2 = 2 \\ n \text{ coresp. lui } H^+ = 1 \end{matrix}$$

$$\text{deci } E_H = \frac{RT}{2F}rH - \frac{RT}{F}pH \text{ și dacă însemnăm } \frac{RT}{F} = K$$

atunci relația devine:

$$E_H = \frac{K}{2}rH - K\,pH$$

K este o constantă care variază cu temperatura și la 25° este egală cu *0,058*. Relația devine astfel:

$$E_H = \frac{0{,}058}{2}rH - 0{,}058\,pH = 0.029\,rH - 0.058\,pH$$

Scanned with OKEN Scanner

sau :

$$rH = \frac{E_H + 0.058\ pH}{0.029}$$

Aceasta este relaţia care dă valoarea rH în funcţie de E_H şi de pH-ul soluţiei. Pentru un sistem, având pH-ul=0, relaţia devine :

$$rH = \frac{E_H}{0.029}$$

Pentru a avea date comparative între potenţialele de oxidoreducere ale diverselor sisteme, se lucrează la acelaş pH şi atunci potenţialele se pot exprima în E^H (volţi) ; sau se lucrează la pH-uri diferite, şi se exprimă în rH în valoarea căruia se ia în seamă la calcul, pH-ul sistemului.

După cum pH-ul corespunde în mod convenţional logaritmului invers al concentraţiei ionilor de H^+, *rH-ul* corespunde, tot convenţional, *logaritmului invers al concentraţiei hidrogenului molecular,* ceeace este de fapt logaritmul invers al presiunii hidrogenului. De exemplu, dacă presiunea în atmosfere a sistemului este egal cu 10^{-14}, rH = 14. Electrodul normal de hidrogen am văzut că are $(H_2) = 1$, presiunea de o atmosferă şi concentraţia ionilor de $(H^+) = 1$, deci rH = 0 şi pH = 0 caracterizează electrodul normal de hidrogen :

$$rH = \frac{E_H + (0.058 \times 7)}{0.029}$$

Un sistem capabil de a *ceda electroni* sistemului constituit din electrodul standard normal de hidrogen va avea în raport cu acesta *un potenţial de oxidoreducere negativ,* având pentru electroni o afinitate negativă.

Un sistem capabil de a primi electronii sistemului constituit din electrodul standard normal de hidrogen va avea în raport cu acesta *un potenţial de oxidoreducere pozitiv,* având pentru electroni o afinitate pozitivă.

In general, dacă două sisteme oxidoreductoare se găsesc în contact, sistemul având E_H-ul mai negativ, respectiv un rH mai mic, va putea reduce sistemul, având E_H-ul mai pozitiv (mai mare deci), respectiv rH-ul mai mare.

De exemplu, sistemul cu $E_H = -0{,}100$ rH = 10,6 poate reduce (deci primi electroni) sistemul cu $E_H = \pm O$ şi rH = 14.

Sistemul cu $E_H = -0{,}200$ $rH_2 = 7{,}3$ poate primi electroni, deci reduce sistemul cu $E_H = +0{,}200$ $rH_2 = 20{,}6$ sau sistemul cu $E_H = +0{,}200$ respectiv rH = 20,6 poate ceda electronii, deci poate oxida sistemul cu $E_H = -0{,}200$ respectiv $rH_2 = 7{,}3$, ceace revine la acelaş lucru.

Un sistem dat va fi deci *reductor sau oxidant* faţă de alt sistem, după cum *potenţialul său de oxidoreducere este mai negativ* decât al acestuia *sau mai pozitiv,* sau după cum va avea un rH mai mic al acestuia sau mai mare. Astfel, mediul cu rH = 20 va oxida mediul cu rH = 17, iar mediul cu rH = 17 va oxida mediul cu rH = 14.

Invers, mediul cu rH = 14 va reduce mediul cu rH = 17 ; mediul cu rH = 17 va reduce mediul cu rH = 20. Noţiunea de oxidant şi reductor este astfel esenţialmente relativă.

Un sistem având rH = 0 corespunde unui sistem complect reductor în raport cu toate celelalte sisteme. Un sistem cu rH = 28,9 corespunde unui sistem complect oxidant în raport cu toate celelalte sisteme. Valo-

Scanned with OKEN Scanner

rile sub rH 28 corespund unor soluţii reductoare, valorile peste 28 unor soluţii total oxidante. Celulele apar astfel ca şi cum ar fi tamponate din punctul de vedere al potenţialului de oxidoreducere între anumite limite compatibile cu viaţa celulară. In celulă există continuu reacţii de oxidare şi reducere care ar putea modifica mult acest potenţial. Este posibil că alte sisteme oxidoreductoare intervin ca nişte sisteme tampon de oxidoreducere pentru a menţine o anumită limită a valorii potenţialului celular. Pentru ca tampoanele de oxidoreducere să funcţioneze ca atare trebue să aibă anumite însuşiri : să fie destul de labile pentru a putea interveni imediat şi în destul de mare cantitate pentru ca acţiunea lor să fie eficace. După *Wurmser*, glucidele ar îndeplini aceste condiţii şi ar avea un rol important ca tampoane de oxidoreducere. Ele ar determina potenţialul de oxidoreducere în jurul valorii rH = 15. Deasemenea, acidul ascorbic, glutationul, cisteina, ar avea şi ele rol de tampoane de oxidoreducere care tind să menţină potenţialul în limite compatibile cu viaţa. Există o limită superioară şi una inferioară a potenţialului de oxidoreducere compatibilă cu realizarea sintezelor şi degradărilor intracelulare şi în general cu viaţa celulei. Cunoaşterea potenţialelor de oxidoreducere ale diverselor sisteme din celule este foarte importantă. S'a constatat că fenomenele celulare nu se pot realiza decât în anumite zone ale potenţialului de oxidoreducere şi că maximul de activitate corespunde unei anumite valori a rH-ului.

Dacă se pun ouă de ursin (arici de mare) fecundate în sistemele oxidoreductoare având potenţiale diferite, se constată că în sistemele cu rH între 22—23 are loc o oprire a diviziunii.

Se ştie deasemenea că există microbi strict aerobi, deci care pot trăi în prezenţa oxigenului molecular, microbi strict anaerobi care nu pot trăi în prezenţa oxigenului molecular şi aerobi şi anaerobi facultativi care pot trăi şi în absenţa şi în prezenţa oxigenului molecular.

B. tetanic este un anaerob strict, limita inferioară de creştere corespunde unui rH sub 14. La aerobi, rH-ul este în jurul lui 20.

Faptul că anaerobii nu pot trăi în prezenţa oxigenului molecular nu este datorit însă prezenţei chimice a acestui element, ci potenţialului de oxidoreducere pe care îl realizează. Intr'adevăr, dacă se introduc în mediul de cultură substanţe reductoare de tipul acidului piruvic, cisteinei, glutationului, care reduc şi menţin potenţialul de oxidoreducere la un anumit nivel, se pot cultiva anaerobii şi în prezenţa oxigenului molecular.

Am spus că acest potenţial trebue să fie pentru anaerobi sub 14. Aerobii stricţi au un potenţial de oxidoreducere mai mare, foarte pozitiv, deci pot utiliza oxigenul liber. Anaerobii nu pot fixa decât oxigenul fixat din compuşi, au un potenţial mai mic, negativ, deci putere de reducere mai mare (rH = 0—12). Pentru un germen dat este necesar ca mediul său de cultură să aibă, în afară de compoziţie minerală şi organică adecvată, în afară de pH-ul adecvat, şi rH-ul optim pentru germenul respectiv.

In studiul oxidaţiilor celulare, cunoaşterea potenţialului de oxidoreducere al diverselor sisteme care iau parte la aceste oxidări este foarte importantă, deoarece ne indică locul pe care îl ocupă fiecare sistem în lanţul reacţiilor de oxidoreducere care duc dela substrat, dela metabolit, la H_2O şi CO_2. Valoarea potenţialului de oxidoreducere al diverselor sisteme condiţionează posibilitatea reacţiilor dintre aceste sisteme. El indică anume care reacţii sunt termodinamic posibile şi care nu. Dacă există două sub-

stanţe *a* şi *b* reductibile reversibil, *b* va putea reduce pe *a* numai dacă potenţialul de oxidoreducere al lui *b* este mai negativ decât al lui *a*.

Dacă *a* şi *b* sunt componente care fac parte din lanţul compuşilor ce intervin în oxidoreducerile celulare care duc final la formare de H_2O prin oxidarea hidrogenului din metabolit cu oxigenul molecular, *a* va fi redus înaintea lui *b* şi seria va fi :

substrat $\xrightarrow{-H_2}$ a $\xrightarrow{-2H}$ b $\xrightarrow{2H}$ $O_2 \rightarrow H_2O$

Este probabil că un rH optim trebue să fie menţinut pentru evoluţia normală a celulei în general şi e probabil că funcţionarea anormală a unei celule sau a unui organ se traduce printr'un rH anormal, fie ca o consecinţă, fie ca o cauză.

Noţiunea de aerobioză şi anaerobioză

Cunoaşterea potenţialului de oxidoreducere şi aprecierea intensităţii proceselor de oxidare şi reducere prin valoarea lui a permis stabilirea unei continuităţi între două categorii de fenomene biologice fundamentale, socotite multă vreme absolut distincte : respiraţia şi fermentaţia, respectiv fenomenele în aerobioză şi fenomenele în anaerobioză. Se ştie că fiinţele vii se pot împărţi în două grupe în ceeace priveşte necesitatea lor în oxigen liber molecular : grupa fiinţelor aerobe şi aceea a fiinţelor anaerobe.

1. Fiinţele aerobe nu pot trăi decât în prezenţa oxigenului molecular liber, ele se mai numesc şi oxibiotice; aceste fiinţe respiră.
2. Fiinţele anaerobe nu pot trăi decât în absenţa oxigenului molecular liber, ele se mai numesc şi anoxibiotice; aceste fiinţe fermentează.

Prin introducerea noţiunii de potenţial de oxidoreducere, chimia fizică a pus la îndemână bazele teoretice pentru înţelegerea acestor două fenomene. Sistemele aerobe au un potenţial oxidoreductor destul de pozitiv pentru a putea oxida (deshidrogena) intens şi deci utiliza oxigenul molecular. Sistemele anaerobe au un potenţial oxidoreductor pozitiv foarte mic, respectiv un potenţial oxidoreductor negativ mare, deci o capacitate de reducere (de hidrogenare) mare, astfel că au capacitatea de a-şi scoate oxigenul necesar nu din oxigenul liber, ci din compuşii organici ai acestuia. Deci, între sistemele aerobe şi anaerobe nu există decât o gradaţie a valorii potenţialului oxidoreductor şi nu o relaţie de strictă opoziţie. Intr'adevăr, dacă se clasifică microorganismele în ordinea descrescândă a valorilor potenţialului oxidoreductor, se găseşte o serie continuă care merge dela microbii strict aerobi la cei strict anaerobi, intermediari între ei intercalându-se în raport cu aceste valori aerobii şi anaerobii facultativi. Nu există o opoziţie reală între respiraţie şi fermentaţie, ambele procese sunt legate între ele. La aceeaşi fiinţă vie, în cursul metabolismelor intermediare se constată procese fiziologice concomitente sau succesive. Unele se petrec cu participarea oxigenului molecular, deci aerob, altele fără participarea acestuia, deci anaerob. Exemplul cel mai demonstrativ îl găsim la degradarea glucidelor în muşchi, unde există o fază anaerobă care duce până la acid lactic şi o fază aerobă, care duce până la CO_2 şi H_2O. In prima fază intervin sistemele oxidoreductoare, având un potenţial oxidoreductor destul de negativ pentru a putea realiza reducerile în absenţa oxigenului molecular, pe seama oxigenului din

Scanned with OKEN Scanner

compuşi. In faza a doua, aerobă, intervin sistemele cu potenţiale oxido-reductoare prea puţin negative pentru a putea realiza această reducere, sisteme care nu se pot oxida decât pe seama oxigenului molecular. In acest sens trebue înţelese respiraţia şi fermentaţia (aerobioza şi anaerobioza) ca mecanisme dependente de nivelul potenţialului de oxidoreducere şi nu ca fenomene absolut distincte.

I. Dehidrazele

Dehidrazele sunt enzimele care catalizează oxidoreducerile de tipul oxidărilor reversibile prin pierdere de hidrogen.

Acţiunea lor catalitică constă dintr'o labilizare a hidrogenului din molecula substratului, astfel ca să devină apt de a se uni cu altă moleculă din sistem, capabilă de a-l fixa. Acţiunea de activare se explică în felul următor : dehidrazele sunt ele însele sisteme oxidoreductoare reversibile ; ele pot fi reduse fixând cu uşurinţă hidrogenul de pe substrat, dar pot ceda cu aceeaşi uşurinţă acest hidrogen altei substanţe aflătoare în sistem, capabilă de a-l primi, dar nu direct, ci numai prin intermediul acestor dehidraze. Dehidraza a realizat astfel, prin intermediul ei, un transport de hidrogen ; deaceea li se poate spune dehidrazelor cu drept cuvânt transportori de hidrogen enzimatici.

In nomenclatura dată de Wieland se numeşte *donator de hidrogen* compusul care cedează hidrogenul ; *acceptor de hidrogen*, compusul care îl primeşte şi *transportor de hidrogen* compusul prin intermediul căruia s'a făcut acest transport, în cazul nostru, dehidrazele. Dacă însemnăm cu DH_2 substanţa donatoare de hidrogen, cu T transportorul de hidrogen, cu A acceptorul de hidrogen, reacţia de oxidoreducere se prezintă astfel :

$$DH_2 + T + A \rightleftarrows D + T + AH_2$$

care se realizează prin următoarele etape intermediare : ca şi cum deci transportorul de hidrogen nu ar fi intervenit deloc în reacţie.

$$DH_2 + T \rightleftarrows D + TH_2$$
$$TH + A \rightleftarrows T + AH_2$$

După Wieland, o reacţie de tipul oxidaţiilor prin pierderea de hidrogen necesită deci :

1. un donator de hidrogen ;
2. un acceptor de hidrogen ;
3. unul sau mai mulţi transportori de hidrogen.

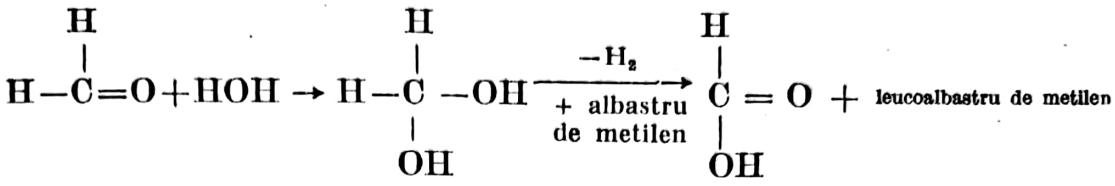
In reacţiile a e r o b e, acceptorul de hidrogen este însuşi *oxigenul molecular* ; în reacţiile a n a e r o b e, orice *alt compus capabil de a fixa acest hidrogen.* Orice compus capabil de a fi redus, ca de exemplu colorantul sintetic albastru de metilen, poate fi folosit ca indicator al unui proces reductor, deoarece prin reducere este transformat în forma sa incoloră, leucoalbastru de metilen.

De exemplu : în lapte există o enzimă, o dehidrază, aşa zisa „enzimă a lui Schardinger", care poate cataliza reacţia de transformare, de oxidare, a unei aldehide în acidul corespunzător, de exemplu aldehida formică în acid icimic.

Dacă se adaugă laptelui crud (nefiert) aldehidă formică şi albastru de metilen, se constată că, atunci când se lucrează în condiţii anaerobe, albastrul de metilen este transformat în forma sa incoloră, leucoalbastrn de metilen ; această transformare e cauzată de o fixare a hidrogenului din

Scanned with OKEN Scanner

molecula donatorului — aldehida — pe molecula acceptorului — albastrul de metilen —, care sub forma sa redusă este incolor :



In condiţii aerobe, adică în prezenţa oxigenului, decolorarea nu mai are loc, deoarece hidrogenul de pe donator este fixat de oxigen cu o viteză mai mare decât de albastrul de metilen, acesta din urmă putând înlocui în condiţii anaerobe oxigenul molecular.

Caracterele generale ale dehidrazelor

1. Sunt strict specifice în raport cu substratul şi în raport cu acceptorul de hidrogen.
2. Sunt distruse la 56° (sunt termolabile).
3. Sunt inhibate în acţiunea lor enzimatică de către uretane, nu sunt inhibate de CO şi cianuri, ceeace le diferenţiază de oxidaze.

Structura chimică a dehidrazelor

Structura chimică a dehidrazelor nu se cunoaşte decât pentru foarte puţine dintre ele. Sunt formate din două componente : *apoenzima,* sau componenta proteinică, şi *coenzima* sau componenta activă.

Apoenzima determină specificitatea faţă de un anumit substrat ; asupra constituţiei acestora nu se cunoaşte încă aproape nimic. Coenzima determină prin gruparea sa funcţională caracteristică mecanismul de reacţie cu care intervine enzima în acţiunea sa catalitică. Activitatea complectă a dehidrazei e în funcţie de ambele componente. Aşa dar, schematic : dehidraza = proteina specifică + codehidraza. Se poate varia *specificitatea* unei dehidraze prin modificarea componentei proteinice, a apoenzimei ; dacă se păstrează aceeaşi coenzimă, mecanismul enzimatic rămâne acelaş, dar substratul asupra căruia lucrează va fi altul. Diversele dehidraze au *coenzime identice,* dar apoenzime diferite. S'a reuşit izolarea şi identificarea chimică a două codehidraze : una din drojdia de bere, alta din globulul roşu şi au fost denumite *codehidraza I* şi *codehidraza II.* Acestea sunt necesare pentru activitatea multor dehidrogenaze.

Codehidraza I a fost izolată prima oară de Harden şi Young din drojdia de bere, deaceea i se mai spune şi cozimază (dar nu e absolut a tuturor dehidrogenazelor).

Codehidraza II a fost izolată de Warburg şi Christian din globulul roşu. Ulterior s'a găsit că este o componentă a tuturor celulelor.

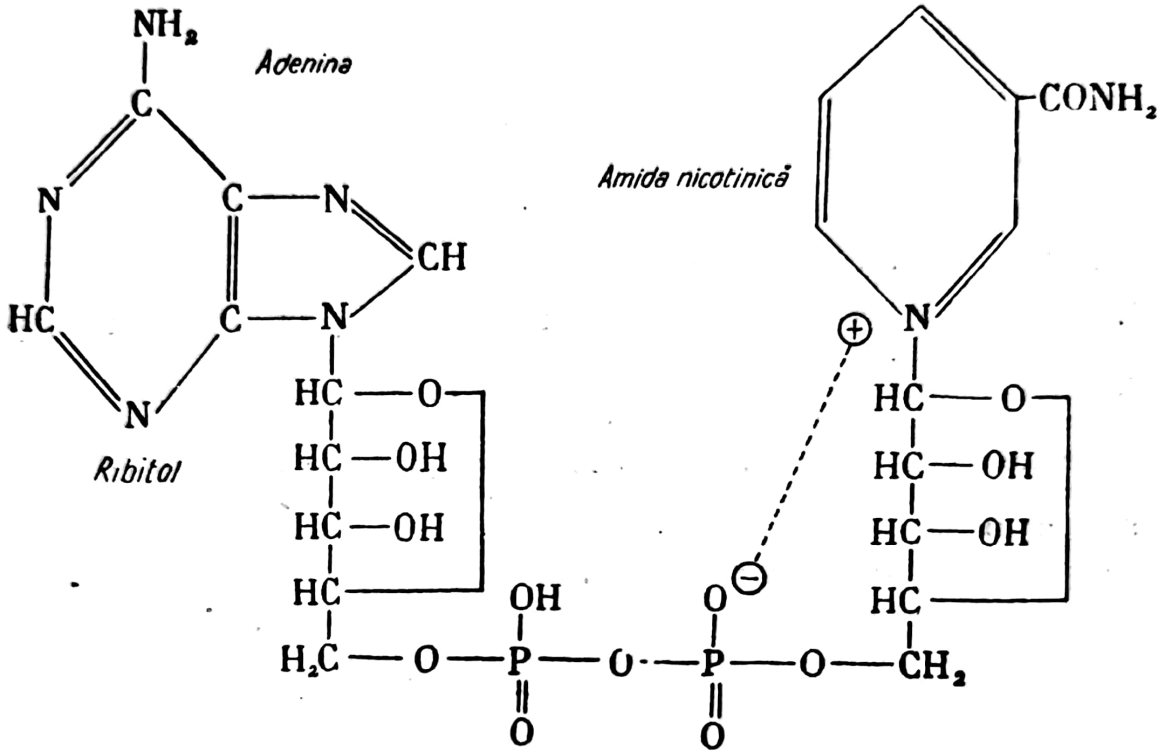
Codehidrazele I şi II au o structură foarte analoagă şi anume conţin :

1. o moleculă de adenină ;
2. o moleculă de amidă a acidului nicotinic (deci nucleul piridinic) ;
3. două molecule de *d*-riboză (*d*-ribofuranoza) ;
4. acid fosforic (orto) şi anume, codehidraza I conţine două molecule de acid fosforic, iar codehidraza II trei molecule de acid fosforic, aceasta fiind singura diferenţă înte ele, deaceea, codehidraza I se mai .numeşte *difosfopiridinnucleotid,* iar codehidraza II *trifosfopiridinnucleotid*

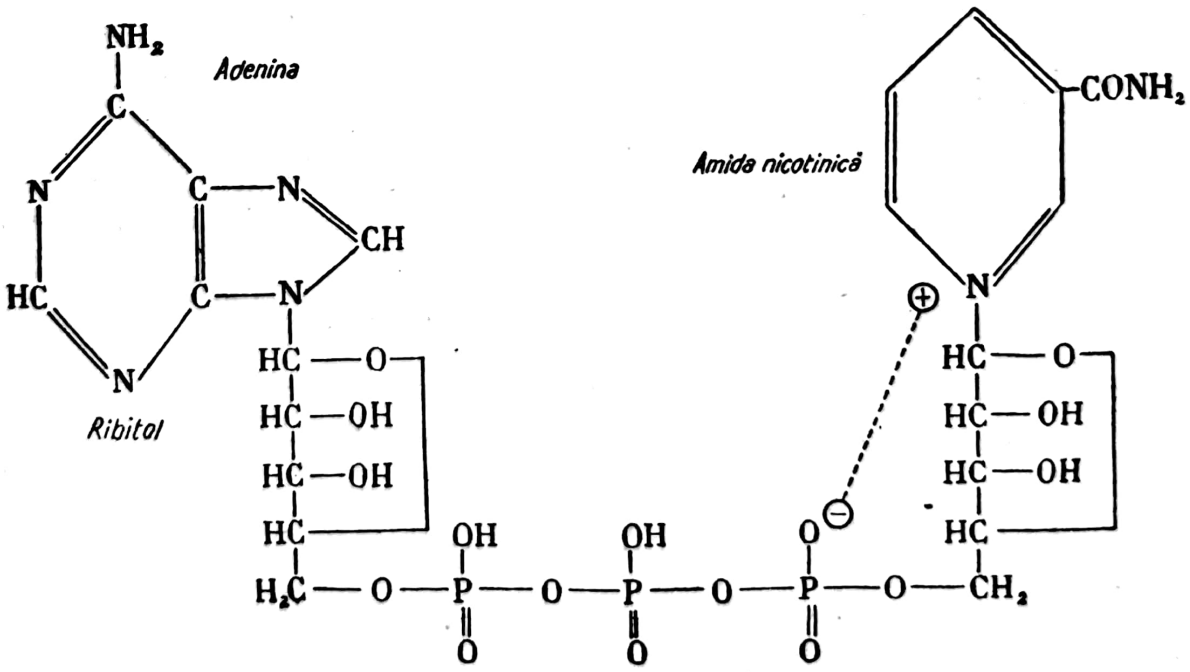
Scanned with OKEN Scanner

Schema generală este pentru amândouă :

amida acidului nicotinic — *d*-riboza — acid fosforic — *d*-ribofuranoza — adenina



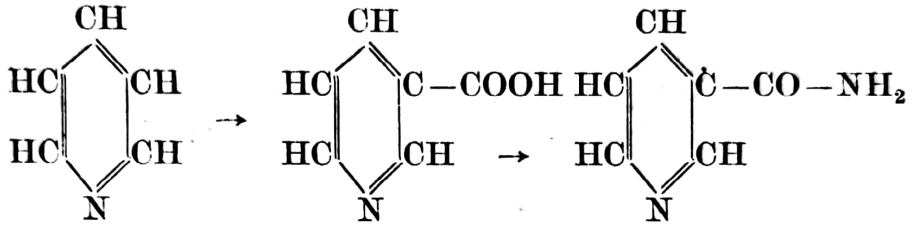
coenzima I (difosfopiridinnucleotid)
(colehidraza I a lui von Euler)



coenzima II (trifosfopiridinnucleotid)
(codehidraza II a lui Warburg)

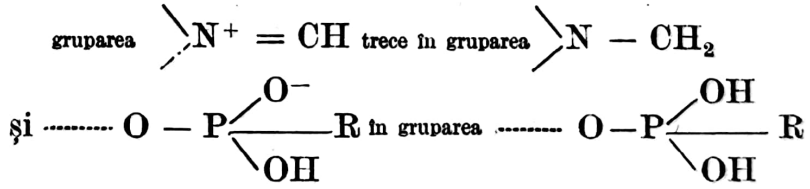
Ambele codehidraze (I şi II) au în fenomenele de oxidoreducere rol de transportor de hidrogen între două componente din sistem, din care una se oxidează prin pierdere de hidrogen, iar cealaltă se reduce fixând acest hidrogen. Schimbul de hidrogen dintre aceste două componente nu se poate face direct între ele, ci numai prin intermediul codehidrazelor, care labilizează hidrogenul. Acţiunea de labilizare este datorită fixării temporare a hidrogenului pe molecula dehidrazei. Dehidraza poate fixa 2 hidrogeni, transformându-se în *dihidrocodehidrază*, graţie existenţei în moleculă a unei grupări funcţionale adecvate, şi anume grupării amida acidului nicotinic.

Se ştie că amida acidului nicotinic e un derivat de piridină :

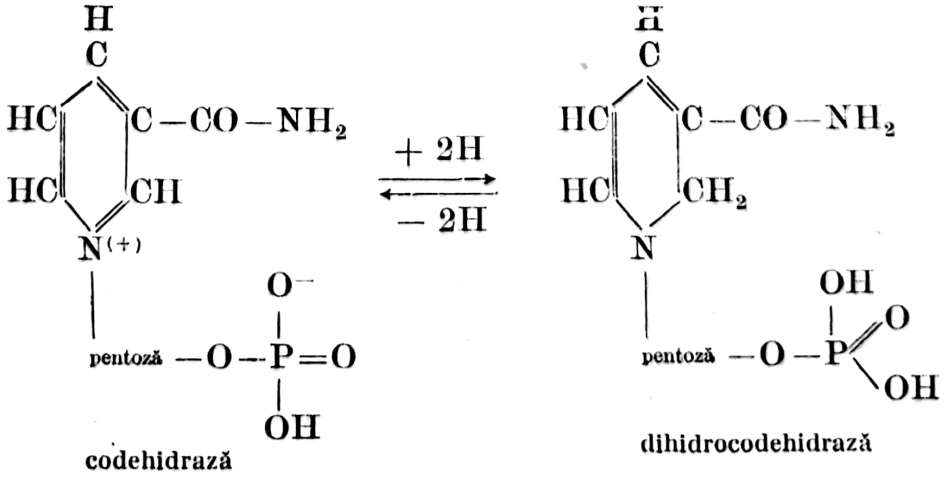


Conţine N în ciclu şi prin intermediul lui se face legătura cu riboza, care la rândul ei face legătura cu restul moleculei prin intermediul acidului o-fosforic.

La acest ciclu piridinic, prin transformarea *N* pentavalent în *N* trivalent se eliberează o valenţă a carbonului vecin, valenţă care va fixa unul din hidrogenii donatorului, celălalt hidrogen fiind fixat la atomul de P de către valenţa ionică eliberată tot prin trecerea dela N pentavalent la N trivalent. Cum se presupune că între acest N şi atomul de P ar fi existat o legătură de tipul legăturilor prin electrovalenţă, prin această fixare se face trecerea la O^- ionic la OH :



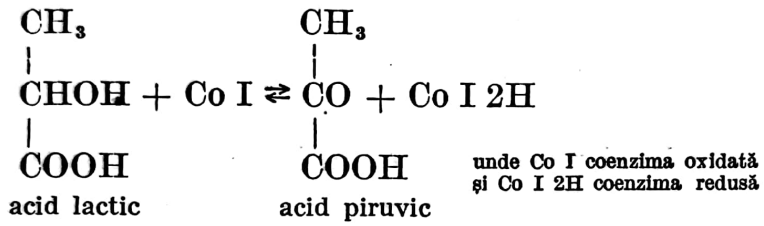
Avem astfel gruparea funcţională :



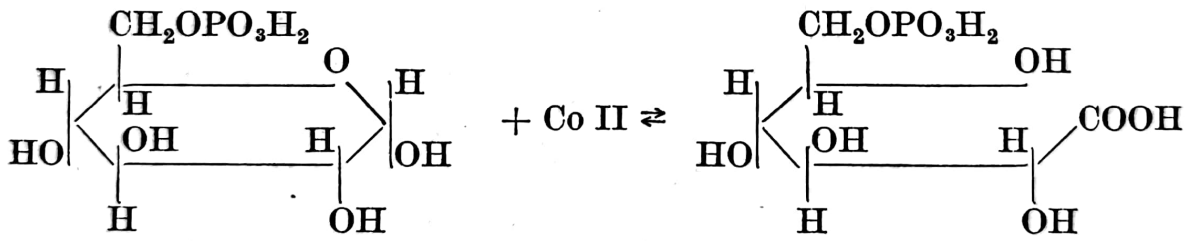
Comportarea acestor coenzime a fost studiată cu ajutorul spectrelor de absorbție în ultraviolet. Sub formă oxidată au o singură bandă de absorbție la 2600 Å, sub formă redusă apare o bandă de absorbție la 3400 Å. Banda de absorbție la 2600 Å aparține adeninei și nicotinamidei. Banda de absorbție la 3400 Å corespunde nicotinamidei reduse, deci oxidarea și reducerea coenzimei au probabil loc la ciclul piridinic.

Codehidraza fixând de pe substrat 2 hidrogeni trece în mod reversibil în dihidrocodehidrază, Co. 2H. Fixarea e temporară, dihidrocodehidraza eliberând cu ușurință hidrogenul sub formă labilizată acceptorului adecvat din sistem. Poziția fiecărui transportor și acceptor de hidrogen este probabil dependentă de valoarea potențialului de oxidoreducere a fiecăruia în parte. Se cunosc însă astăzi o mulțime de dehidraze, pentru activitatea cărora este necesară însă prezența uneia din cele două coenzime.

Astfel, coenzima I (Co I) este necesară acțiunii a vreo 35 de dehidraze diferite, de exemplu dehidrazei care catalizează reacția de transformare a *acidului lactic* în *acid piruvic* în țesutul muscular :



Codehidraza II (Co II) este necesară dehidrazei care catalizează reacția de transformare a esterului Robinson (glucozo-6-monofosfat) în acid fosfogluconic :



l-glucozo-6-monofosfat — acid 6-fosfogluconic

E interesant de amintit că gruparea activă a codehidrazelor I și II, amida acidului nicotinic, este identică cu vitamina PP (previne pelagra), vitamina antipelagroasă. Acesta este un exemplu de relație a enzimelor cu vitaminele și e posibil ca nevoia de această vitamină să fie legată de faptul că este componenta unor enzime indispensabile, care intervin în toate reacțiile de oxidoreducere din organism.

Dehidraze importante care nu necesită însă prezența codehidrazelor I sau II sunt

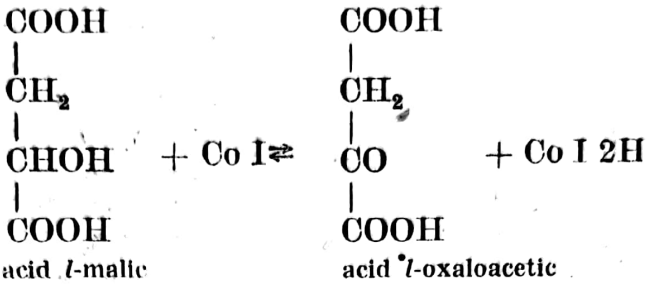
— succinodehidraza, care catalizează reacția de dehidrare a acidului succinic la acid fumaric și lacticdehidrogenaza din levură :

$$HOOC - CH_2 - CH_2 - COOH \rightleftarrows HOOC - CH = CH - COOH$$

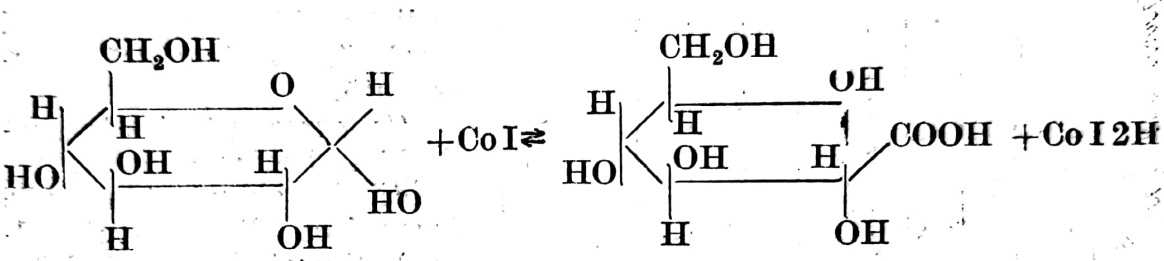
Este o enzimă specifică inhibată competitiv de acidul malonic și oxaloacetic ;

— malicdehidrogenaza, care catalizează transformarea acidului *l*-malic în acid oxaloacetic;

— glucozodehidrogenaza hepatică care catalizează oxidarea δ-glucozei în acid gluconic:



acid *l*-malic — acid *l*-oxaloacetic



δ-glucoza — δ-acid gluconic

II. Fermenţii galbeni sau flavinenzimele

Fermenţii galbeni sunt, ca şi dehidrazele, catalizatori ai oxidaţiilor celulare, intervenind în acest mecanism printr'un transport de hidrogen. Conţin în molecula lor flavine şi o proteină specifică. (Flavinele sunt coloranţi foarte răspândiţi în natură, având o culoare galbenă şi o fluorescenţă galbenă-verde; sunt denumite după organul din care sunt extrase: lactoflavină, ovoflavină, hepatoflavină). Se cunosc vreo 12 fermenţi galbeni. Flavinenzimele se împart în două grupe. In prima, gruparea prostetică activă este flavinmononucleotidul, în a doua adenin flavindinucleotidul, adică un dinucleotid format din unirea flavinei şi adeninmononucleotidului prin intermediul radicalului fosforic. Cel mai bine studiat din prima grupă este:

„fermentul galben de oxidare" al lui Warburg şi Christian. A fost izolat de aceştia din drojdia de bere şi purificat ulterior de Theorell prin

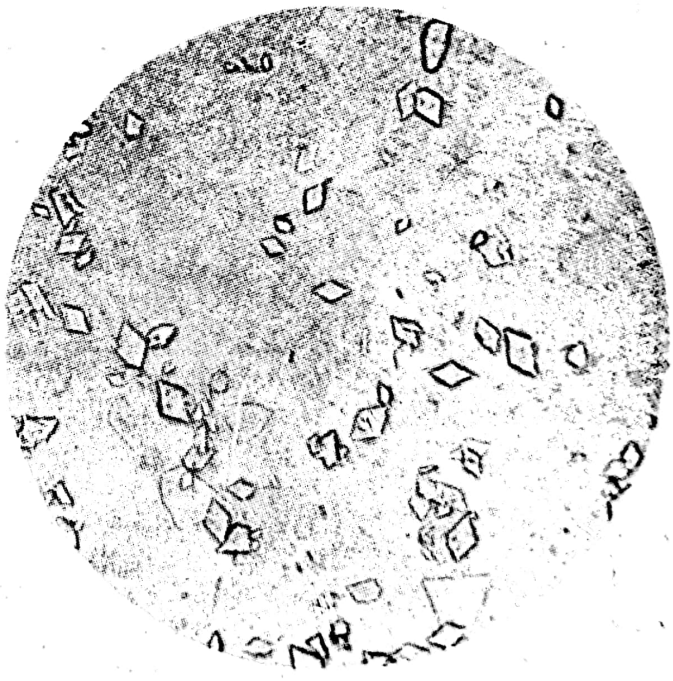


Fig. 88. Cristale de ferment galben din drojdie (×128)

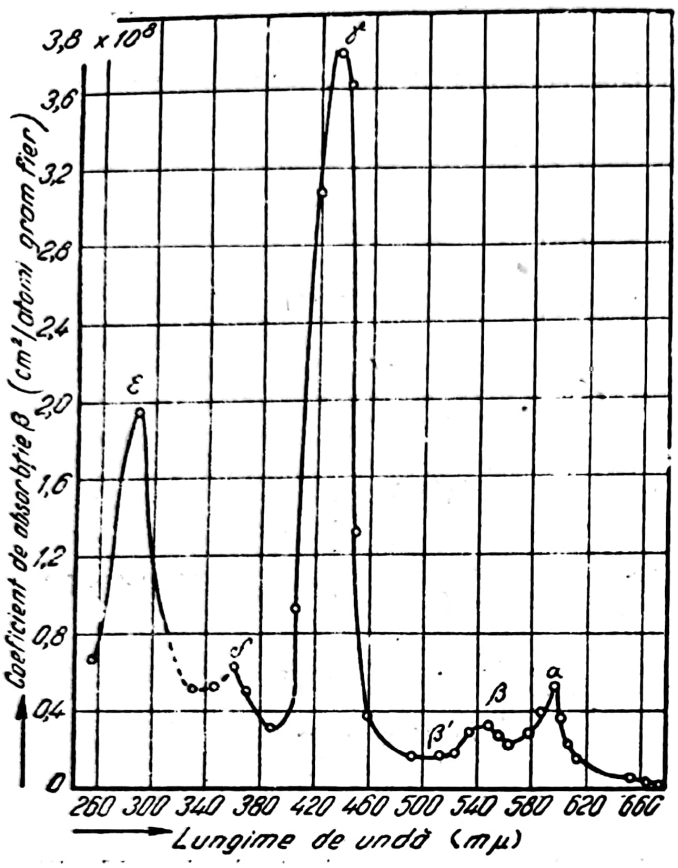


Fig. 89. Spectrul de absorbţie al compusului fermentului respirator (Warburg) cu monoxidul de carbon.

metoda cataforezei la pH = 4,2—4,5 (fig. 88).

Din punct de vedere chimic, fermentul galben de oxidare este o cromoproteidă constituită din două componente, una proteinică (apoenzima) şi alta activă (coenzima). Aceste două componente se pot separa prin dializă faţă de HCl la 0° şi pH 4,2—4,5.

Gruparea proteinică este nedializabilă, termolabilă şi incoloră, de structură necunoscută.

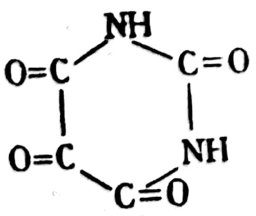
Gruparea activă este dializabilă, termostabilă şi colorată în galben (de unde denumirea de ferment galben). Structura sa chimică e cunoscută şi anume, este un ester fosforic al lactoflavinei. Lactoflavina sau riboflavina este identică cu vitamina B_2. Regăsim aici, ca şi la dehidraze, participarea unei vitamine la structura unei enzime, fapt care poate da indicaţii asupra rolului indispensabil al vitaminelor în organism.

Foarte schematic, structura fermentului galben de oxidare este :

acid fosforic . . . . . proteină

lactoflavină
(vitamina B_2)

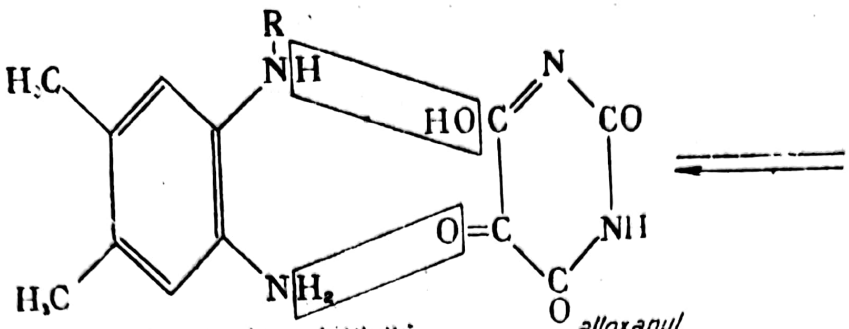
Structura chimică a lactoflavinei se cunoaşte : este un compus format din *d*-riboză şi o izoaloxinază, este izoaloxazinribitil (deaceea i se mai spune lactoflavinei şi riboflavină).



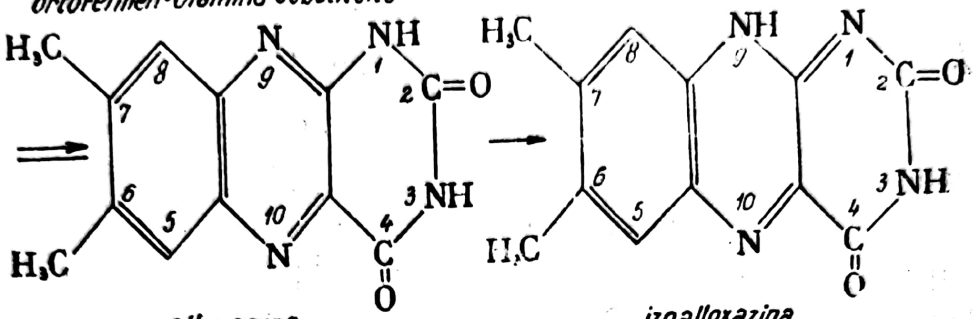
aloxanul

Aloxanul, prin condensare cu ortofenilendiamina substituită dă *aloxazina*, al cărei izomer *izoaloxazina*, care are H la N(9) în loc de N (1), se uneşte la acest azot cu o moleculă ribitol formând *izoaloxazinribitilul*.

Esterificarea cu acid *o-fosforic* a grupării alcoolice terminale din ribitol permite stabilirea unei legături cu apoenzima şi astfel se formează complexul enzimatic care este fermentul galben.



ortofenilen-diamina substituită — alloxanul



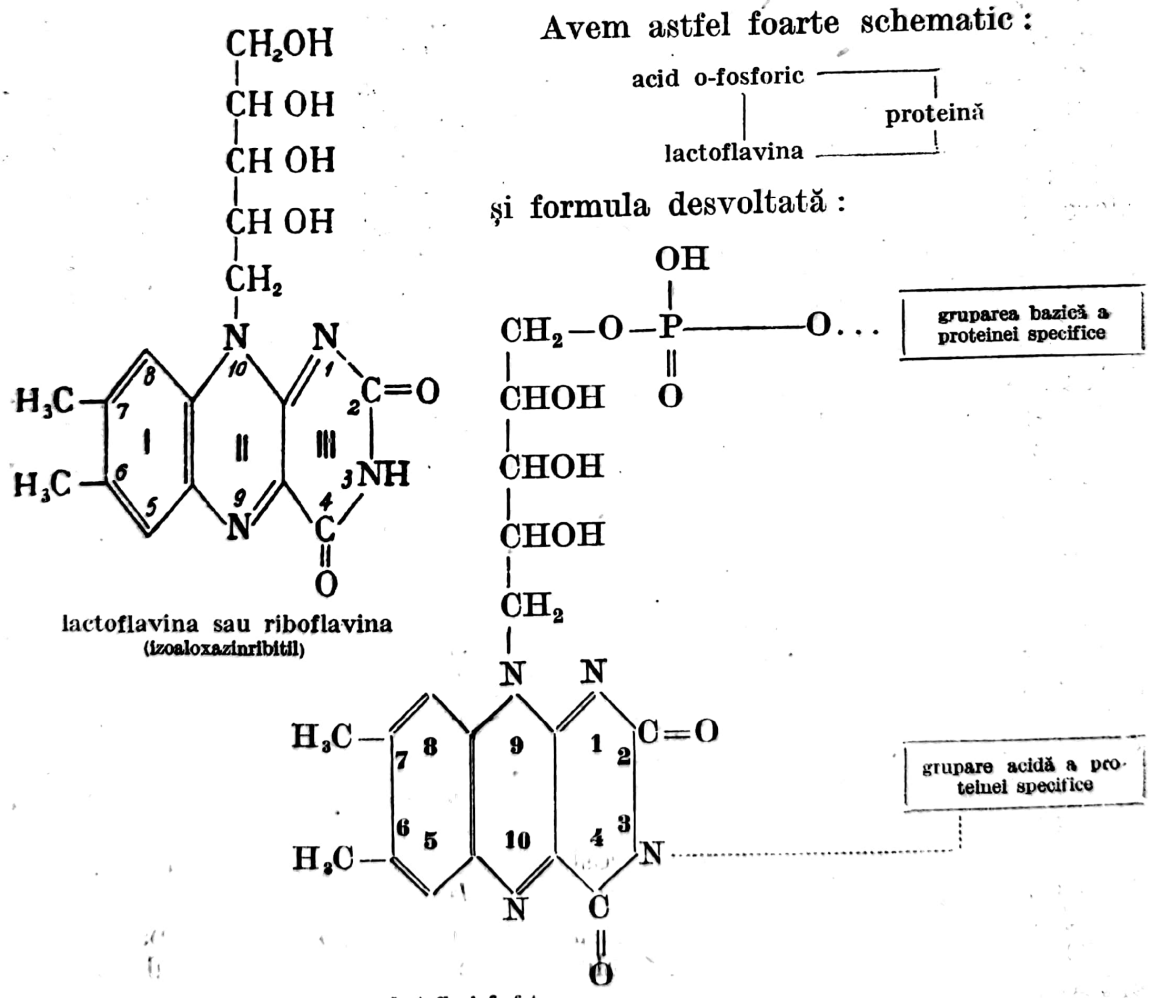
alloxazina — izoalloxazina

Avem astfel foarte schematic :

acid o-fosforic — proteină

lactoflavina —

și formula desvoltată :

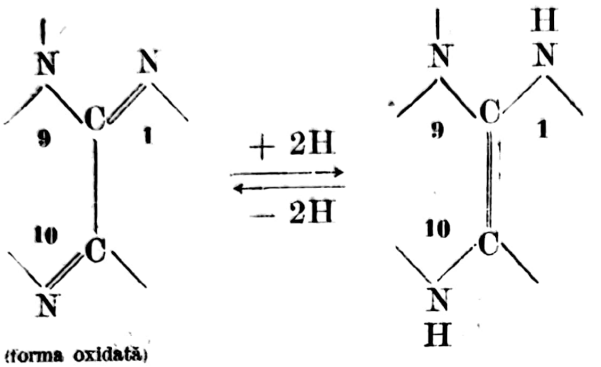


lactoflavina sau riboflavina
(izoaloxazinribitil)

lactoflavinfosfat
(aloxazin mononucleotid)

fermentul galben de oxidare

Proprietatea fermentului galben de a funcționa ca transportor de hidrogen e datorită grupării izoaloxazinice, și anume, prezenței *dublelor legături conjugate dela* N (1) și N (10) care se pot desface astfel ca N (1) și N (10) să adiționeze în mod reversibil câte un hidrogen, iar legătura dublă să se refacă între carbonii vecini conform schemei :



(forma oxidată) (forma redusă „leuco")

Prin hidrogenare, lactoflavina colorată trece în lactoflavină incoloră sau leucolactoflavină. Reacția este reversibilă, leucolactoflavina putând ceda cu ușurință acești hidrogeni altui acceptor din sistem, regenerând astfel lactoflavina.

Pe acest mecanism reversibil de oxidoreducere se sprijină rolul fermentului galben în lanțul oxidărilor celulare. Se pune întrebarea dece lactoflavina singură (vitamina B_2), necuplată cu proteina, deci în afara fermentului galben, nu îndeplinește acest rol de transportor de hidrogen ; se poate explica acest lucru în felul următor : întâi, proteina imprimă lactoflavinei caracterul de specificitate al enzimei prin stabilirea contactului cu substratul și, în al doilea rând, prin acțiunea pe care o are această componentă asupra valorii potențialului de oxidoreducere. Astfel, potențialul de oxidoreducere normal *Eo* al fermentului galben este egal cu —0,06 volți la pH = 7 și 38° ; al flavinei singure este de — 0,217 volți, deci cuplarea flavinei cu proteina scade potențialul negativ al acesteia cu 0,157 volți. Enzima are un potențial oxidoreductor mai pozitiv decât flavina singură, deci o capacitate de oxidare mai mare în raport cu alte componente din sistem ; ea poate astfel accepta mai cu ușurință hidrogenii acestora decât sub forma de lactoflavină necuplată cu proteina. Posibilitatea unui sistem de a oxida sau reduce un altul este în funcție de valoarea potențialului de oxidoreducere, un sistem dat fiind oxidant sau reductor față de un altul, după cum potențialul de oxidoreducere este mai pozitiv sau mai negativ.

Deoarece flavina singură conține totuși gruparea funcțională ce îi conferă caracterul de transportor de hidrogen, i se atribue și ei singură, necuplată cu proteina, rol de tampon de oxidoreducere. Fermentul galben, spre deosebire de alte enzime, nu are o specificitate strictă, astfel că poate funcționa ca transportor de H într'un mare număr de reacții de oxidare a diverselor substrate, de exemplu, a esterilor hexozofosforici, hexozodifosforici, a glucozei, a acidului nitric, acidului malic, acidului gliceric și în genere în toate dehidrogenările în care intervine în prima etapă codehidraza II. Rolul fermentului galben este tocmai de a transporta hidrogenul fixat de codehidraza II, pe alt acceptor din sistem, regenerând codehidraza din dihidrocodehidrază. Fermentul galben este astfel o enzimă care catalizează dehidrogenarea coenzimei II redușe. Coenzima II ar fi astfel substratul specific al fermentului galben.

Dihidrocodehidraza apare astfel ca substratul specific al fermentului galben. Dacă însemnăm :

SH_2 = substratul sub forma sa redusă

S = substratul sub forma sa oxidată
D—CoII = Co II oxidată (și cuplată cu proteina specifică substratului)
D—Co II H_2 = Co II redusă (sau dihidrocoenzima cuplată cu proteina specifică substratului)
D = o dehidrază specifică substratului (ferment intermediar)
F = fermentul galben oxidat
FH_2 = fermentul galben redus
Co = coenzima oxidată
CoH_2 = coenzima redusă

avem într'un anumit stadiu al oxidărilor, relațiile următoare :

$$SH_2 + D—Co + F \rightleftarrows S + D—Co—FH_2$$

care se petrec prin stadiile :

$$SH_2 + D - Co \rightleftarrows S + D - Co - H_2$$

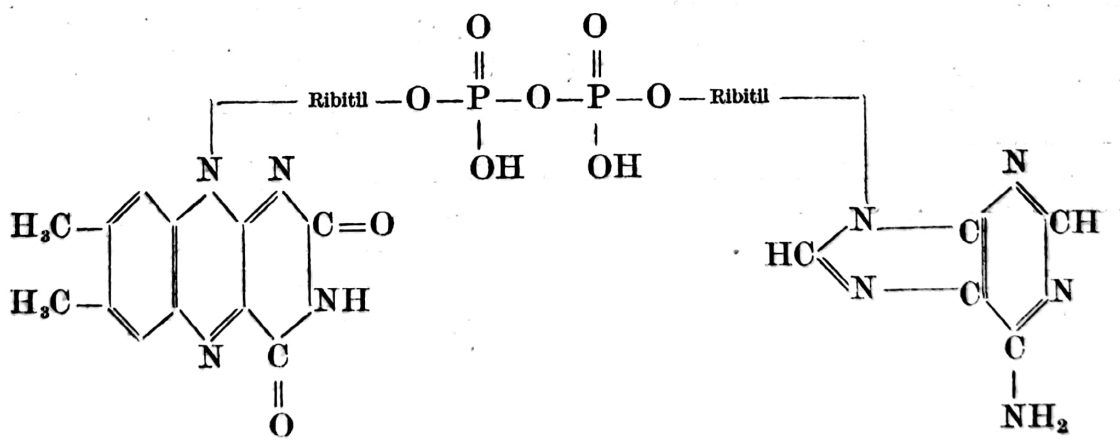
$$D - Co - H_2 + F \rightleftarrows D - Co + FH_2$$

Regenerarea fermentului galben oxidat (F) din fermentul redus (FH^2), rezultat al oxidărilor celulare, se poate face în organism în măsură mică de către însuși oxigenul molecular și numai când presiunea oxigenului este relativ mare (este deci o enzimă autooxidabilă), dar în majoritatea sa el este regenerat de către alți acceptori de hidrogen pe care îi vedem în cele ce urmează.

Citocromreductaza este o flavinenzimă descoperită în ultimii ani (Haas). Este enzima care poate reduce direct citocromul C, care este un flavinmononucleotid.

Fermentul galben al lui Warburg și citocromreductaza nu se găsesc în general în țesuturile animale ; la acestea se găsesc alte flavinenzime.

Diaforaza a fost izolată din mușchiul cardiac. Diaforaza are drept grupare prostetică adeninflavindinucleotidul ; catalizează specific oxidarea Co I redusă ; codehidraza I e astfel substratul specific al diaforazei.



Aloxazinadenindinucleotid
(gruparea prostetică a diaforazei)

Fermentul galben, citocromreductaza și diaforaza aparțin dehidrogenazelor și ar avea funcția specifică de a oxida formele reduse ale Co I sau Co II sau ambele, iar citocromreductaza ar fi capabilă de a reduce direct citocromul C.

Xantinoxidaza şi *d*-aminoaciddesaminaza sunt şi ele flavinenzime, dar aparţin grupei oxidazelor.

Vom reveni asupra acestora la capitolul respectiv.

Funcţia flavinenzimelor ar fi aceea de a dehidrogena în mod specific Co I şi Co II, iar a citocromreductazei aceea de a dehidrogena citocromul C oxidat şi Co II.

Citocromii sunt catalizatori ai oxidaţiilor celulare, ca şi dehidrazele şi fermenţii galbeni, dar intervin în aceste reacţii ca transportori de electroni.

Sunt heteroproteide, respectiv hemocromogene, cu gruparea prostetică feroporfirinică (heme sau hematine) legată de o proteină specifică. Sunt hemocromogene analoage hemoglobinelor. Aceste hemine celulare se găsesc aproape în toate celulele şi ţesuturile capabile de a consuma rapid oxigenul molecular (bacterii, levuri, insecte). Se găsesc în cantitate cu atât mai mare cu cât capacitatea respiratorie a celulei este mai mare. Nu se găsesc în celulele care trăiesc în anaerobioză (de exemplu, la bacteriile obligatoriu anaerobe). Mac Munn (1883), care a semnalat primul prezenţa acestor substanţe în ţesuturile animalelor din diversele regnuri, le numeşte histohemine. Keilin (1925) le-a identificat pe cale spectroscopică, precizând rolul lor biologic. Se numesc citocromi din cauza răspândirii lor în toate ţesuturile. Pentru studiul lor se pretează cel mai bine drojdia de bere şi muşchii toracici ai albinelor, unde se găsesc în mare cantitate. Identificarea şi dozarea lor se face pe cale spectroscopică. Citocromii pot exista sub forma lor oxidată (în acest caz prezintă un spectru de absorbţie difuz) şi sub formă redusă, prezentând un spectru de absorbţie caracteristic format din patru benzi de absorbţie notate cu *a*, *b*, *c*, şi *d*; *a* se găseşte în regiunea 6046 Å, *b* la 5665 Å, *c* la 5500 Å şi *d* la 5210 Å (1 A = 10^{-8} cm), banda *d* este la rândul ei un complex de trei benzi fine. (Fig. 90 *a*).

Ulterior s'a dovedit (Keilin) că ceeace se înţelge sub citocrom este de fapt un amestec de trei hemocromogene diferite notate în ordinea lor alfabetică cu literele *a*, *b*, *c*, fiecăruia corespunzându-i câte două benzi caracteristice din cele menţionate mai sus, şi notate α_1 β_1, pentru *a*, α_2 şi β_2 pentru *b*, α_3 şi β_3 pentru *c* (fig. 90 II).

La diversele organisme, poziţia celor patru benzi de adsorbţie ale citocromului redus variază în anumite limite.

Structura chimică a citocromilor. Citocromii aparţin, din punct de vedere chimic, clasei hemocromogenelor. Sunt compuşi formaţi dintr'o grupare prostetică, care este feroporfirina, şi o grupare proteinică specifică. Din cei trei citocromi, diferenţiaţi între ei pe cale spectroscopică, cel mai bine cunoscut este citocromul *c*, fiind cel mai stabil; citocromul

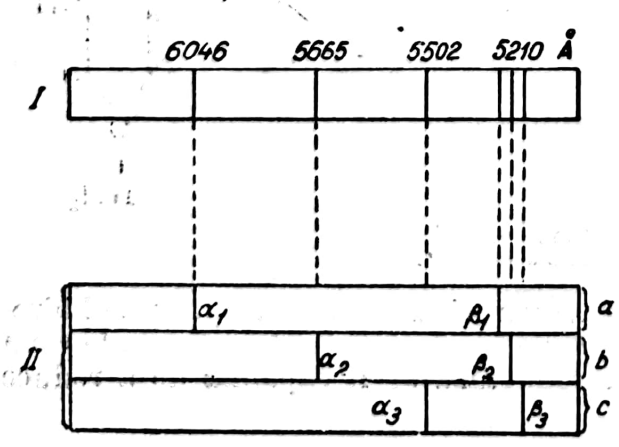


Fig. 90.

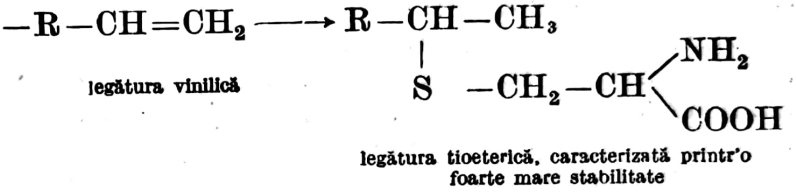
I. Spectrul de absorbţie al amestecului de citocromi obţinut prin iluminarea unor extracte de drojdie de bere.

II. Spectrul disociat al celor 3 citocromi sub forma lor redusă.

a şi *b* sunt labili şi se distrug în timpul operaţiilor de izolare şi purificare, astfel că structura lor nu a putut fi cercetată. Este probabil că cei trei citocromi se deosebesc între ei şi nu aparţin porfirinelor aceleiaşi serii. Citocromul *c* a fost bine studiat, fiind obţinut în stare de mare puritate din levură sau din inimă de bou. Preparatul (Theorell) are o greutate moleculară ~ 13 000 şi un punct izoelectric 9,7. Spectrul de absorbţie a citocromului *c* este un spectru caracteristic derivaţiilor de hem (fig. 91). Prin hidroliza lentă în soluţie 20% HCl şi în tub închis s'au identificat următoarele componente din molecula citocromului:

1. o porfirină posedând două catene laterale care conţin sulf, două grupări carboxilice şi două grupări aminice în poziţia α;
2. un atom de fier;
3. o proteină.

1. Legătura dintre porfirină şi catena laterală se face prin intermediul legăturilor vinilice din molecula porfirinei, cu atomul de sulf din molecula catenei laterale, realizând astfel o legătură de tipul eglăturilor tioeterice.



2. Legătura cu proteina se face prin intermediul grupării carboxilice şi aminice din catenele laterale. Legăturile sunt de tip peptidic, deci mai uşor disociabile. In afară de acestea, pentru anumite valori de pH (4—9), legătura cu proteina s'ar stabili şi prin intermediul fierului (vezi formula).

3. Fierul din molecula porfirinei este Fe^{+++} în cazul formei oxidate şi Fe^{++} în cazul formei reduse a citocromului. In mod normal ei ar trebui să se găsească în celule sub forma lor redusă, deoarece potenţialul de oxidoreducere al celulelor în condiţii de anaerobioză este $E_o = -0{,}240$ volţi, iar acela al citocromului *c* egal cu + 0,253 volţi. In condiţii de aerare puternică a celulei pot fi însă sub forma lor oxidată. In timpul vieţii celulare se fac însă continue treceri dela o formă la cealaltă, lucru care se poate urmări experimental prin spectrul de absorbţie, cel al formei oxidate fiind difuz.

Trecerea reversibilă dela citocromul redus la cel oxidat se face printr'un transport de electroni la atomul de Fe conform relaţiei:

$$Fe^{+++} \underset{+\,2\,e}{\overset{-\,2\,e}{\rightleftharpoons}} Fe^{++}$$

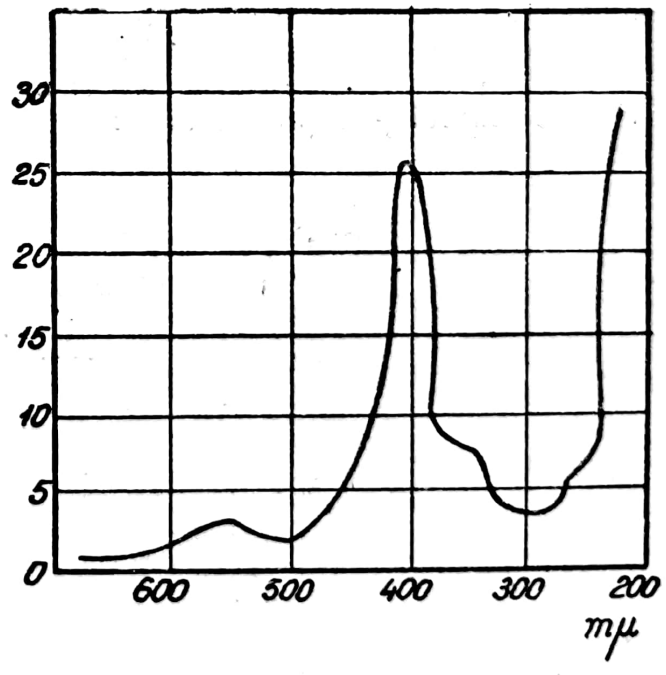


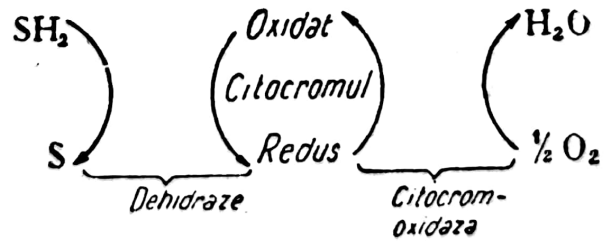
Fig. 91. Spectrul de absorbţie al fericitocromului C.

Prin acest mecanism, ei intervin ca sisteme de oxidoreducere intermediare în reacţia de combinare dintre hidrogenul substratului şi oxigenul molecular. Ei nu pot cataliza însă direct această reacţie, ci deabia după labilizarea hidrogenului din substrat de către celelalte sisteme oxidoreductoare, cum sunt dehidrazele şi flavinele şi după labilizarea oxigenului molecular de către oxidaze. Acest lucru s'a dedus din faptul că narcoticele, care inhibă acţiunea dehidrazelor, de exemplu uretanele, inhibă reducerea citocromilor, dar nu şi oxidarea lor. Toxicele respiratorii CO, CNH, care inhibă oxidazele, inhibă şi oxidarea citocromilor.

Citocromii sunt deci catalizatori ai oxidărilor celulare, dar nu pot interveni decât după prealabila acţiune a dehidrazelor, respectiv a fermentului galben; deasemenea nu pot ceda direct decât extrem de lent hidrogenul fixat oxigenului molecular, ci numai prin intermediul unei alte enzime, de data aceasta o oxidază numită citocromoxidaza sau fermentul respirator.

Natura enzimei capabile de a reoxida citocromul C s'a putut identifica atunci când s'a recunoscut faptul că, deşi citocromul nu se combină cu cianurile sau CO, totuşi aceştia împiedică oxidarea lui în celulă. Trebue deci să fie o altă componentă din sistem care intervine în oxidarea citocromului şi este inhibată în acţiunea sa de către aceste toxice. Această componentă a fost identificată ulterior ca aparţinând grupei oxidazelor şi vom vedea că este citocromoxidaza identică cu fermentul respirator (sau numai o componentă foarte intim legată cu aceasta). Dacă se adaugă în sistemul celular cianuri în concentraţie M/1000, aproximativ 80—90% din respiraţia totală a celulei este înlăturată.

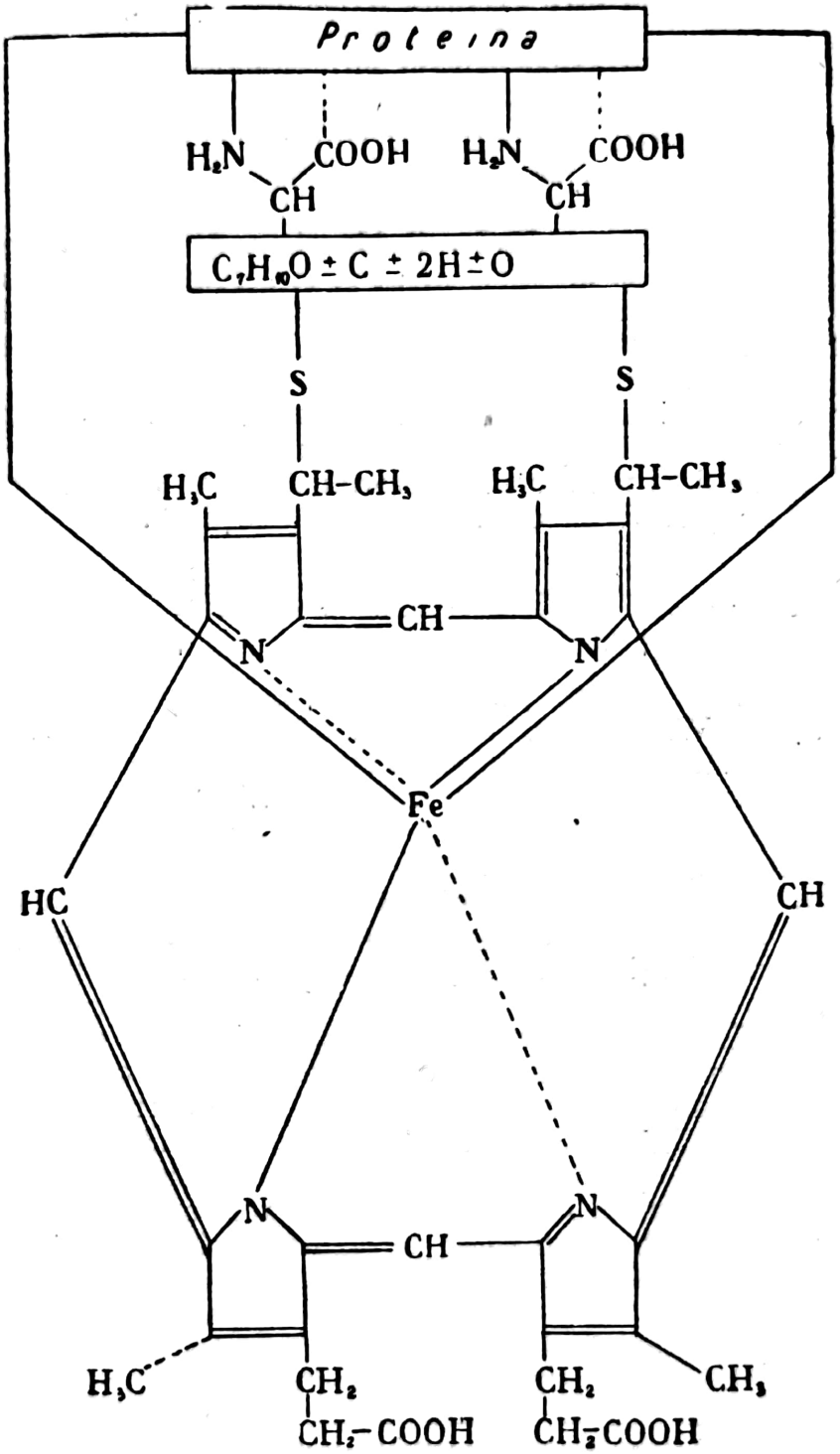
Citocromii sunt grupa de transportori de hidrogen extrem de importanţi în respiraţia celulară. Sunt reduşi de către hidrogenul substratului prin intermediul dehidrazelor, fierul din moleculă trecând dela forma ferică (oxidată) în forma feroasă (redusă) şi cedează acest hidrogen labilizat oxigenului molecular pe calea citocromoxidazei. In felul acesta, prin oxidări şi reduceri succesive, mici cantităţi de citocrom pot contribui la oxidarea unor mari cantităţi de substrat. Schematic se poate reda această poziţie a citocromului în felul următor:



unde SH_2 este substratul

S este substratul oxidat de către dehidraze care cedează hidrogenul fixat de el, citocromului.

Citocromul redus este oxidat la rândul său de citocromoxidaza, care, singură, poate ceda acest hidrogen oxigenului molecular cu formare de H_2O.



citocromul C

III. Oxidazele

Oxidazele sunt enzimele ce catalizează oxidările celulare, în care acceptorul de hidrogen este exclusiv oxigenul molecular.

Acţiunea lor nu se exercită asupra hidrogenului din substrat, ca în cazul dehidrazelor, fermenţilor galbeni, citocromilor, ci asupra acceptorului final al acestui hidrogen, oxigenul molecular.

Oxidazele labilizează oxigenul molecular făcându-l apt a se uni cu hidrogenul prealabil şi succesiv labilizat de către dehidraze, fermenţi galbeni, citocromi, produsul final al combinaţiei fiind H_2O (produsul final al oxidaţiilor celulare) sau H_2O_2. Oxidazele sunt şi ele sisteme oxido-reductoare reversibile şi acţionează, ca şi citocromii, printr'un transport de electroni. Caracterul comun al oxidazelor, caracter care le diferenţiază de dehidraze, este de a fi inhibate de CO, CNH, sulfuri, azide (Na_3N) şi de a nu fi inhibate de uretane.

Structura lor chimică nu este bine cunoscută. Sunt metalproteide, metalul din molecula lor putând fi pentru unele Fe, pentru altele Cu. Prezenţa metalului în molecula lor determină mecanismul de acţiune catalitică, prin transport de electroni conform realţiilor :

$$Fe^{+++} \underset{+\,2e}{\overset{-\,2e}{\rightleftharpoons}} F^{++} \quad \text{sau} \quad Cu^{++} \underset{+\,e}{\overset{-\,e}{\rightleftharpoons}} Cu^{+}$$

Dintre oxidaze, printre primele mai bine cunoscute este *fermentul respirator* al lui Warburg, cunoscut şi sub numele de *citocromoxidază* şi *indofenoloxidază*. Cercetările recente au arătat însă că nu există identitate absolută între fermentul respirator al lui Warburg şi citocromoxidază (Keilin) sau indofenoloxidază. Citocromoxidaza ar fi o componentă a fermentului respirator, totuşi faptele nu sunt încă pe deplin lămurite.

Citocromoxidaza este enzima care catalizează oxidoreducerea citocromului *c*, are deci ca substrat specific citocromul *c*. Se găseşte în toate celulele şi ţesuturile şi pentru acţiunea sa necesită prezenţa oxigenului molecular (gazos).

Citocromoxidaza este o *heminproteidă*, conţine în complexul său o *proteină* şi, ca grupare prostetică, o *hemină*, ca şi citocromii. Structura sa încă nu este bine cunoscută, deoarece nu a fost izolată. Argumentele care l-au făcut pe Warburg să atribue citocromoxidazei structura unei hemine sunt bazate pe următoarele fapte experimentale şi observaţii indirecte, deoarece nu s'a reuşit până acum izolarea acestei enzime.

1. E inhibată parţial sau total de cianuri, sulfuri, azide ; acest lucru indică faptul că în moleculă trebue să existe Fe, deoarece se ştie în general că acţiunea catalitică a Fe e inhibată de aceste substanţe. Ele formează cu fierul compuşi extrem de stabili, împiedicând regenerarea catalizatorului, lucru fundamental în fenomenul de cataliză.

2. E inhibată de CO în absenţa luminii şi se regenerează la lumină, fapt care indică prezenţa unei grupări heminice în moleculă, deoarece se ştie că heminele formează cu CO compuşi care se descompun uşor la lumină, compuşi fotosensibili. Formarea şi desfacerea acestor compuşi se poate urmări pe cale spectroscopică. Warburg a studiat astfel acţiunea diverselor radiaţii monocromatice din spectru asupra desfacerii complexului CO — hemină. Acţiunea radiaţiilor luminoase este în funcţie de

lungimea de undă a radiației (fig. 90). Există o intensă bandă de absorbție la 4360 Å. El constată spectre identice cu ale altor compuși carboxihemoglobinici și deduce de aci că fermentul respirator este o feroporfirină strâns legată ca structură de hematine.

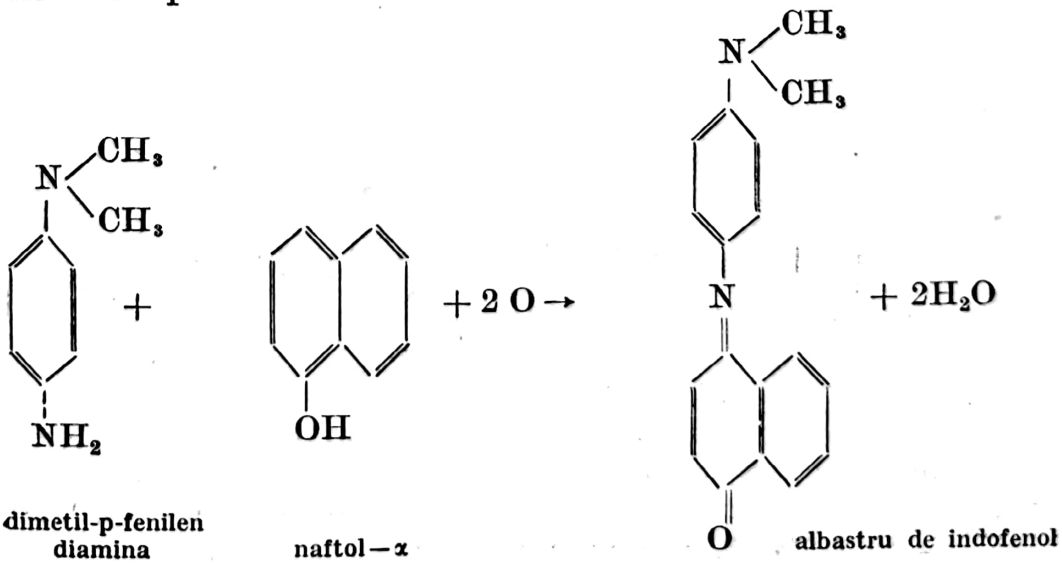
Studiul spectrului de absorbție al complexului CO — citocromoxidază indică formarea unui compus CO — hemină, dar nu analog cu acela al hematinelor din globulul roșu sau cu al citocromilor, ci analog cu acela al hematinei din sângele unui vierme *Spirographis*, hematină cunoscută sub numele de cruorină (care constitue pigmentul sanguin la acest vierme).

Din aceste fapte experimentale se deduce că citocromoxidaza conține fier în moleculă și are structura unei hemine. Datorită fierului din moleculă catalizează reacțiile de oxireducere printr'un transport reversibil de electroni de pe $Fe^{+++} \underset{+2e}{\overset{-2e}{\rightleftarrows}} Fe^{++}$ întocmai ca și citocromii, cu deosebirea esențială că acest transport de electroni se face pe oxigenul molecular ca acceptor, conform reacției: $1/2\ O^2 + 2$ citocromoxidaza $- Fe^{+++} \underset{+2e}{\overset{-2e}{\rightleftarrows}} O^{--} + 2$ citocromoxidaza $- Fe^{++}$. Prin acest transport, oxigenul molecular e labilizat și poate primi hidrogenul labilizat la rândul său de pe molecula citocromului redus (care, cedând acest hidrogen, se transformă în citocrom oxidat).

In felul acesta, citocromoxidaza face posibilă regenerarea citocromului oxidat și acesta este roiul său direct în oxidările celulare, citocromul redus neputând fi oxidat direct de către oxigenul molecular, ci deabia după labilizarea sa de către această enzimă.

Se admite în general că citocromoxidaza nu-și poate exercita acțiunea decât fixată în structura celulei. Nu s'a reușit până acum izolarea citocromoxidazei în afară, fapt care explică dece respirația celulară e condiționată de integritatea celulei.

Am spus că citocromoxidaza e cunoscută și sub numele de indofenoloxidază (Keilin), deoarece ea poate fi pusă în evidență cu ajutorul mult cunoscutei reacții pentru oxidaze în celule (reacția na-di). Această oxidază catalizează reacția de oxidare între dimetil-p-fenilendiamina și naftolul α cu producerea albastrului de indofenol conform reacției:



dimetil-p-fenilen diamina — naftol—α — albastru de indofenol

Reacţia e cunoscută sub numele de reacţia „na-di" dela primele litere ale celor doi compuşi (naftol şi diamină) care iau parte la reacţie. Reacţia e frecvent utilizată, şi anume, se inoculează în ţesuturi în mediu de carbonat de sodiu α naftol şi dimetilparafenilendiamina; în ţesuturile care conţin citocromul C şi citocromoxidază se obţine o coloraţie albastră. Se admite că citocromoxidaza face posibilă oxidarea citocromului C şi acesta la rândul său oxidează reactivul, cu formare de albastru de indofenol.

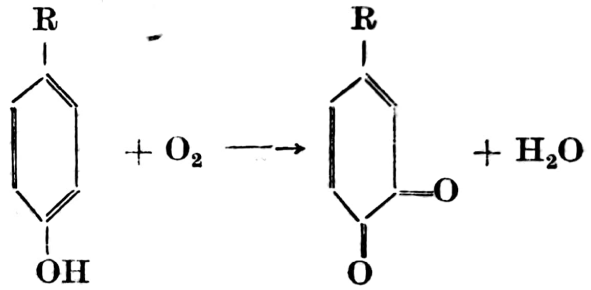
Oxidazele care conţin cupru

Cuprul intră în locul fierului în structura unor oxidaze: tirozinaza, lacaza, acid ascorbicoxidaza. Aceste enzime sunt tot metalproteine şi anume cuproproteine, şi catalizează, ca şi ferooxidazele reacţiile de oxido-reducere printr'un transport de electroni, conform reacţiei:

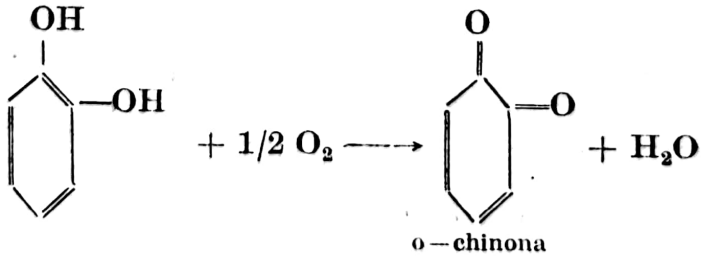
$$Cu^{++} \underset{\leftarrow}{\overset{\rightarrow}{\overset{-e}{}}} Cu^{+} \underset{\rightarrow}{\overset{-e}{}} Cu$$

Acţiunea lor de oxidare ar consta dintr'un transport de electroni de pe substrat pe metal şi de pe metal pe oxigenul molecular. Aceste enzime se găsesc în special la plante care conţin substratul lor (fenoli) (tirozinaza şi lacaza).

Fenoloxidazele au drept substrat fenolii şi pot fi monofenoloxidaze şi polifenoloxidaze:



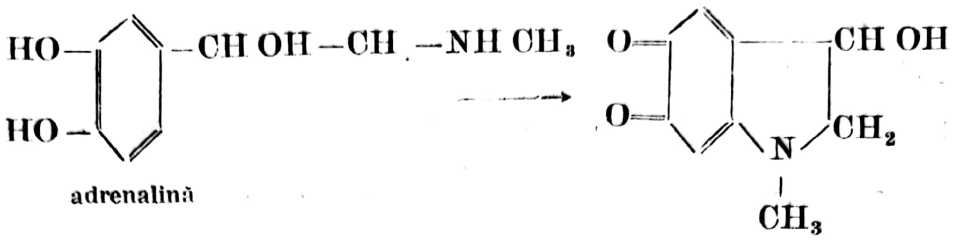
o—chinona



o—chinona

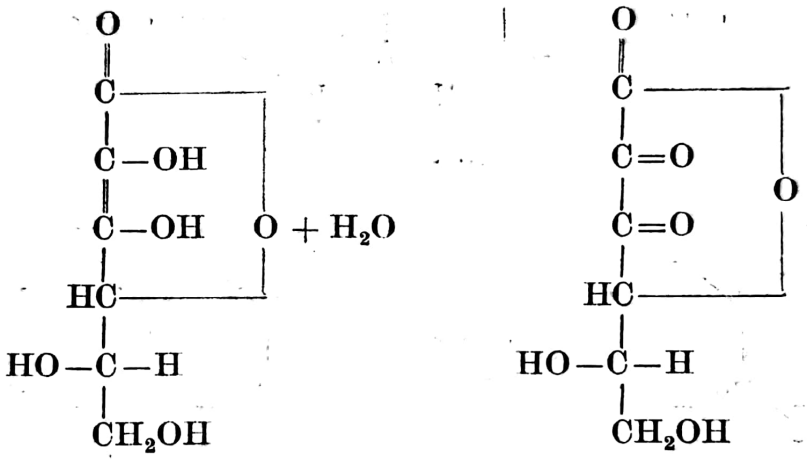
Tirozinaza are drept substrat tirozina şi ar fi răspunzătoare de formarea pigmentului brun la animale. In albinism, unde este o lipsă de melanine, lipseşte şi tirozinaza. Formarea melaninei din tirozină trece probabil printr'un prim stadiu de formare a chinonei.

Transformarea adrenalinei în adrenocrom este probabil catalizată tot de o fenoloxidază :



adrenalină — adrenocrom

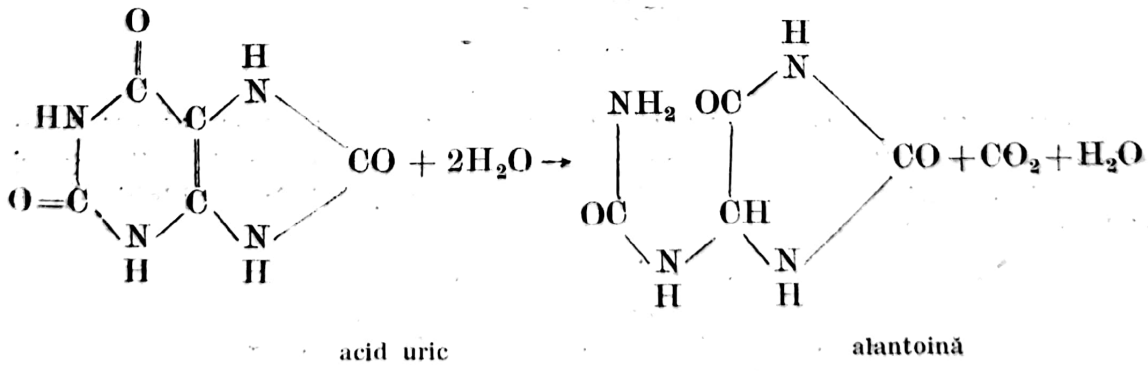
Acid ascorbicoxidaza are drept substrat acidul ascorbic ; catalizează reacția de transformare a acidului ascorbic în acid dehidroascorbic.



acid *l*-ascorbic — acid *l*-dehidroascorbic

Dopaoxidaza este enzima care oxidează *l*-3, 4-dihidroxifenilalanina (sau dopa) în melanină. Acționează după tirozinaza. Se pare că razele ultraviolete transformă tirozina în dopa.

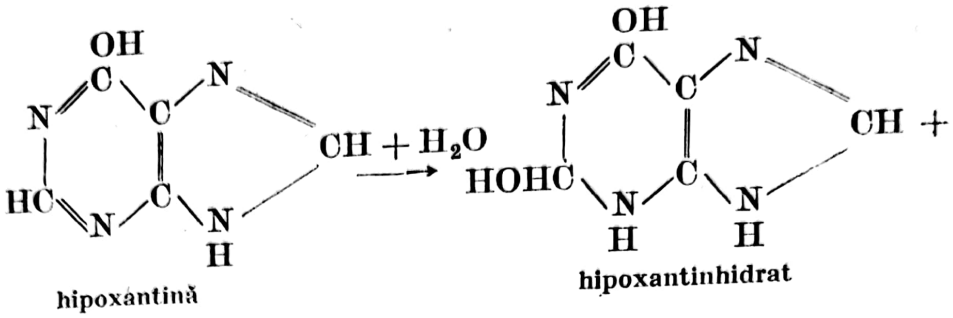
Uricaza catalizează oxidarea acidului uric în alantoină :



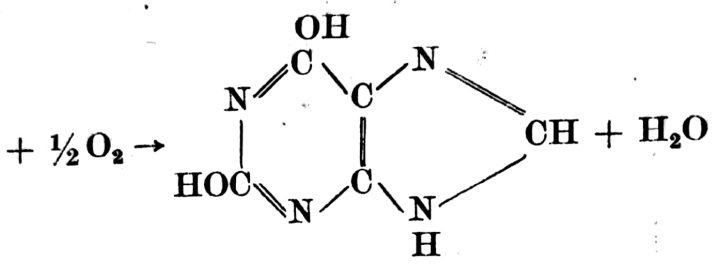
acid uric — alantoină

Enzima se găsește în ficatul animalelor neuricolitice (la om și câinele dalmațian, acidul uric e secretat ca atare).

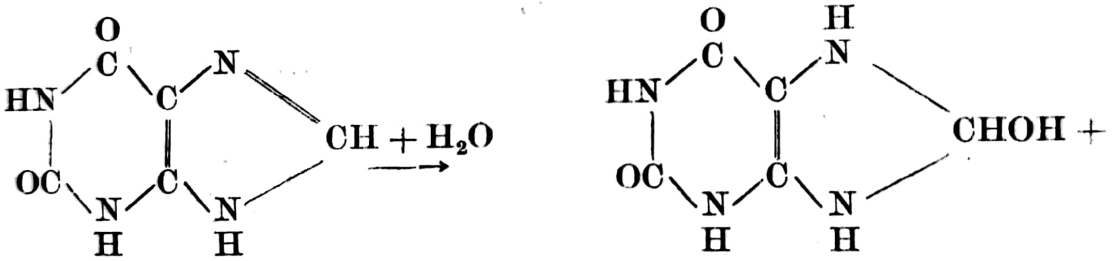
Xantinoxidaza este o flavinoxidază; este prezentă în lapte, catalizează oxidarea hipoxantinei în xantină și a xantinei în acid uric:



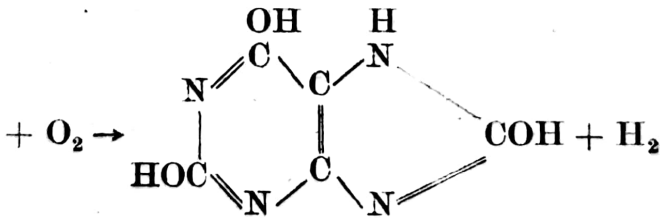
hipoxantină — hipoxantinhidrat



xantină

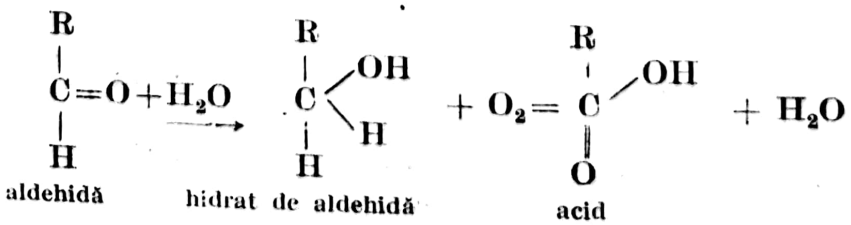


xantină — xantinhidrat



acid uric

Xantinoxidaza este specifică față de purine, este însă identică cu *enzima lui Schardinger* din lapte care lucrează asupra unei serii întregi de aldehide, deci mai are și un alt tip de acțiune, oxidând aldehidele în acizi corespunzători:



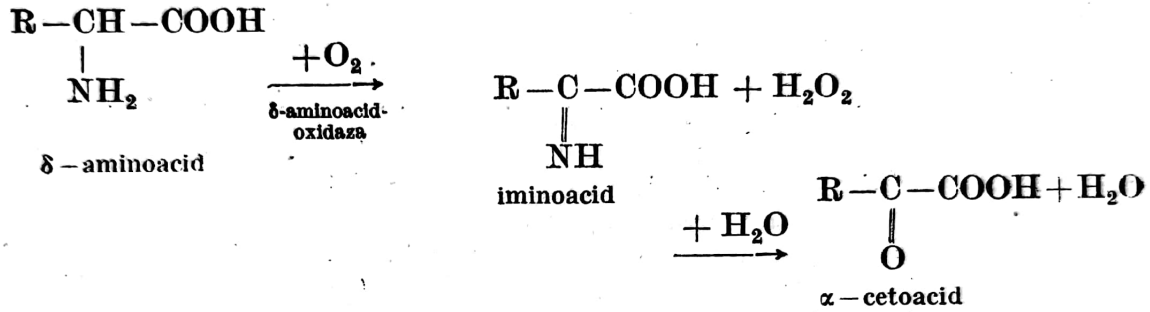
aldehidă — hidrat de aldehidă — acid

Deasemenea, xantinoxidaza catalizează şi procesul de dismutaţie a xantinei în acid uric şi hipoxantină; reacţie de oxidare a unei molecule din substrat pe seama altei molecule care se reduce

$$2 \text{ xantină} = \text{acid uric} + \text{xantină}$$

Reacţia de dismutaţie se petrece în anaerobioză în absenţa oxigenului molecular, când aceeaşi enzimă foloseşte o moleculă din substratul său ca donator de hidrogen, iar a doua moleculă ca acceptor de hidrogen. Este o reacţie analoagă reacţiei lui Cannizzaro, de dismutaţie a aldehidelor.

δ-aminoacidoxidaza face parte din grupa flavinenzimelor, catalizează diaminarea oxidativă a *d*-aminoacizilor în α-cetoacizi cu formare de H_2O_2 şi amoniac:

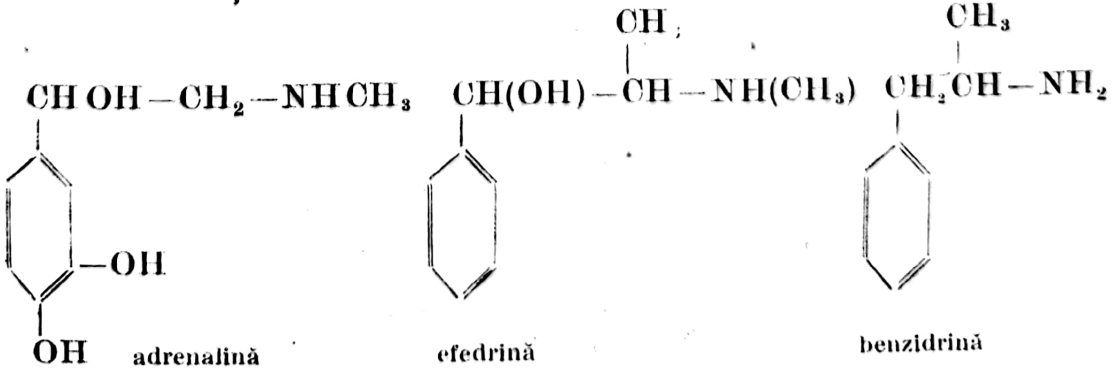


Enzima apare în ficatul şi rinichiul mamiferelor. Este de notat faptul interesant că enzima catalizează reacţia de deaminare numai a *d*-aminoacizilor şi nu a *l*-aminoacizilor naturali.

d-aminoacidoxidaza are drept grupare prostetică adeninflavindinucleotidul, grupare cu un spectru de absorbţie caracteristic, dar care, la adăugarea unui *d*-aminoacid în condiţii anaerobe, este schimbat, ceeace indică o reducere a acestei grupări: adăugând oxigen, se produce reoxidare.

Aminooxidazele se găsesc în cantităţi mici în ţesuturi, în special în rinichi, mai puţin în ficat, suprarenale, pancreas. Au drept substrat aminele, pe care le transformă în aldehidele corespunzătoare $R—CH_2—NH_2 \xrightarrow{+O_2} R—CH=NH + H_2O_2 \xrightarrow{+H_2O} R—CHO + NH_3$.

Aminooxidaze interesante sunt acelea care au drept substrat tiramina şi adrenalina şi — fapt interesant — acestea sunt inhibate de aminele care conţin o grupare metil în poziţia α. De exemplu, aminooxidaza, care are drept substrat adrenalina, este inhibată de efedrină sau benzidrină, cu care are relaţii structurale:



Diaminooxidazele

Catalizează oxidarea unor amine ca histamina, putresceina, cadaverina şi agmatina. Histaminaza are drept substrat histamina, amină farmacologic foarte importantă. Se credea că fenomenele de şoc anafilactic sunt asociate cu formarea de histamină şi pentru a le înlătura s'a încercat medicaţia cu histaminază.

Penicilinaza ar fi o oxidază care poate fi produsă de unele bacterii (de exemplu b. coli, stafilococii deveniţi rezistenţi la penicilină, etc.), capabilă de a distruge penicilina.

Peroxidaze şi catalaze

Peroxidul de hidrogen format în procesele de oxidare catalizate, după cum am văzut, de către unele oxidaze, fiind toxic, inhibă o serie de enzime. Celula se apără cu ajutorul unor catalizatori capabili de a distruge H_2O_2, şi anume, cu ajutorul enzimelor cunoscute sub numele de peroxidaze şi catalaze.

Peroxidazele şi catalazele sunt *heminproteide* ca şi citocromii şi citocromoxidaza, toate înrudite din punctul de vedere al structurii lor cu materia colorantă a sângelui. Fiecare are însă proprietăţi specifice datorite probabil componentei lor proteinice specifice.

Peroxidazele se găsesc răspândite în special la plante. Se găsesc în lapte şi leucocite. In prezenţa apei oxigenate H_2O_2 (peroxidului de hidrogen) sau a altor peroxizi (organici), ele catalizează oxidarea unui mare număr de fenoli şi amine aromatice ca pirogalolul, gaiacolul, tirozina, adrenalina, bilirubina, benzidina, etc. Peroxidaza nu e, deci, specifică în acţiunea sa. Grupa prostetică a peroxidazelor este probabil foarte apropiată de a hemoglobinelor, dar probabil că au o proteină specifică diferită de a acesteia. Hemoglobina are şi ea o acţiune peroxidazică sau, mai exact, o acţiune pseudoperoxidazică. Este însă de un milion de ori mai puţin activă decât peroxidaza. E de notat că majoritatea derivaţilor de hem sau hematină posedă o slabă activitate peroxidazică. Acţiunea pseudoperoxidazică a hemoglobinei e utilizată ca test pentru hemoglobină în reacţiile Mayer, Adler, Weber. Hemoglobina pusă în contact cu apa oxigenată şi cu un acceptor de oxigen catalizează reacţia de descompunere a acesteia, eliberând oxigenul activ, care se va fixa pe acceptor, oxidându-l; dacă forma redusă a acceptorului e incoloră, iar cea oxidată colorată, se poate pune în evidenţă acţiunea peroxidazică prin această variaţie de culoare. De exemplu, în reacţia Kastle Mayer de punere în evidenţă a hemoglobinei, acceptorul de oxigen e fenolftaleina redusă incoloră, care prin oxidare trece în fenolftaleină oxidată, colorată în roşu în mediu alcalin. Este o reacţie extrem de sensibilă.

In reacţia Weber, gaiacul (din soluţia de rezină de gaiac în alcool) devine albastru prin oxidarea acidului gaiaconic din rezina de gaiac.

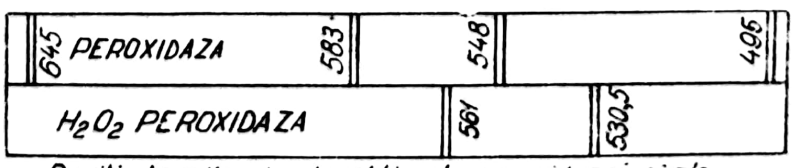


Fig. 92 — Poziţia benzilor de absorbţie ale peroxidazei şi ale compusului H_2O_2-peroxidaza

Fig. 93. Cristale de catalază (din eritrocite de bou)

Reacția se folosește pentru punerea în evidență a activității peroxidazice în general. Transformarea pirogalolului în purpurogalină, compus colorat în portocaliu, a fost folosită ca o metodă colorimetrică pentru determinarea prezenței peroxidazelor. Peroxidaza formează un complex cu substratul său H_2O_2, fapt dovedit prin spectrul de absorbție (vezi fig. 92).

Catalazele (fig. 93, 94) sunt enzime extrem de răspândite, aproape la toate ființele vii. Concentrația catalazei variază foarte mult dela organ la organ. La mamifere, concentrația cea mai mare este în eritrocite și ficat. Sunt, ca și peroxidazele, heminproteide și, ca pentru toate enzimele

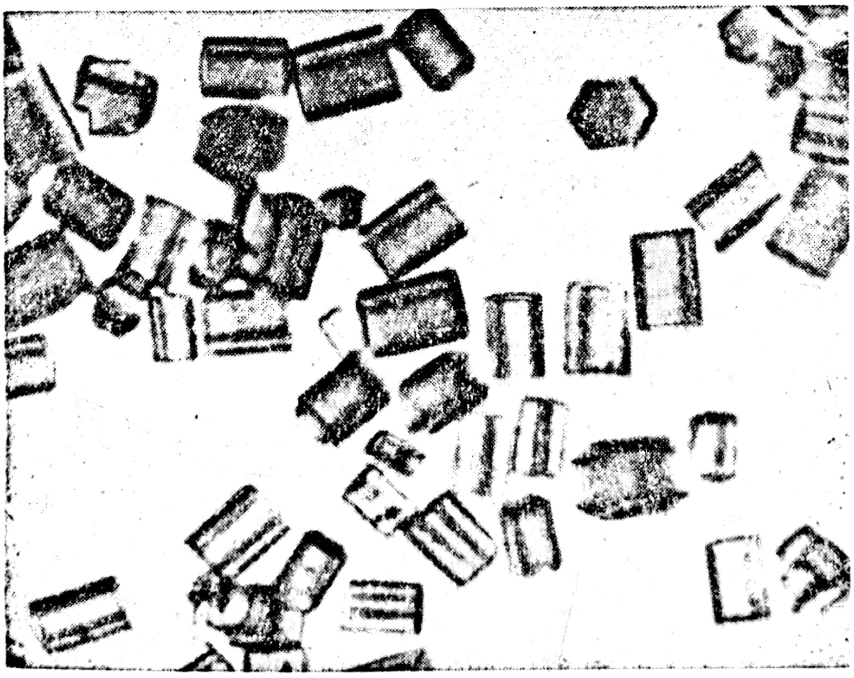


Fig. 94. Cristale de catalază hepatică (bou)

Scanned with OKEN Scanner

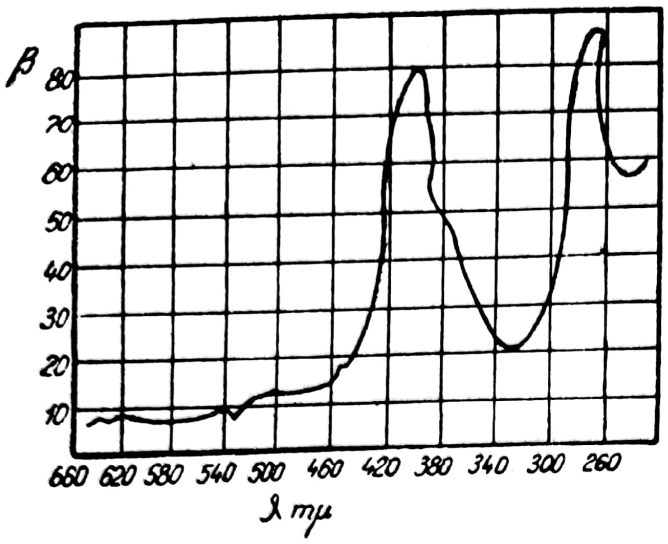


Fig. 95. Spectrul de absorbţie al catalazei

care conţin fier separarea în cele două componente este dificilă. Pe cale spectroscopică s'a dovedit că gruparea prostetică e aceeaşi ca a hemoglobinei (fig. 95). Acţiunea catalazei este strict specifică. Ea descompune peroxidul de hidrogen (H_2O_2) cu formare de apă şi oxigen molecular (gazos).

$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

Este una din cele mai active enzime: 1 moleculă catalază poate descompune pe secundă $4 \cdot 2 \times 10^4$ mol. H_2O_2 la O^0 sau 1 g catalază-fier pură produce la O° din H_2O_2 2740 l oxigen pe oră. Rolul catalazei în celule şi ţesuturi este de a descompune apa oxigenată formată în ultima fază a oxidărilor celulare. Intr'adevăr, s'a constatat că, în absenţa catalazei, apa oxigenată transformă hemoglobina într'un produs de degradare pirolică, cunoscut sub numele de *pentdiopent* (care îşi datoreşte numele faptului că prezintă o bandă de absorbţie caracteristică la 525 mμ).

Catalaza are astfel o acţiune de apărare a hemoglobinei. In afară de acest rol de apărare i se atribue rolul de regenerare a oxigenului, intervenind în oxidarea unor metabolite importante. S'a reuşit purificarea şi cristalizarea catalazei. Conţine în moleculă fierul sub forma „feri" Fe^{+++}. Se imaginează modul de acţiune a catalazei, de descompunere a apei oxigenate, ca o acţiune în lanţ, şi anume, în felul următor: catalaza, respectiv Fe^{+++} din moleculă — formează cu H_2O_2 o combinaţie nestabilă: H_2O_2 — catalaza. S'a reuşit stabilizarea acestui compus intermediar în soluţie de piridină şi complexul H_2O_2 — hemină a fost pus în evidenţă pe cale spectroscopică. Dacă însemnăm catalaza cu „Fe—OH" şi catalaza-peroxid cu „Fe^{++}—OOH", avem:

1) $Fe^{+++} - OH + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{++} OOH + H_2O$
2) $Fe^{++} OOH + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{+++} OH + H_2O + O_2$

In această combinaţie, ionul feric Fe^{+++} e redus de către H_2O_2 la ion feros Fe^{++} cu descompunerea H_2O_2 în H_2 şi O_2. O parte din oxigenul desvoltat serveşte la reoxidarea ionului feros în ion feric conform relaţiilor:

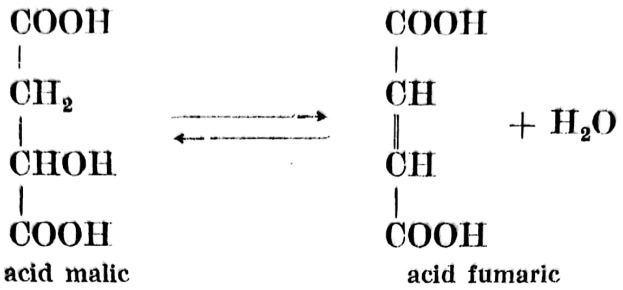
$$4Fe^{+++} + 2H_2O_2 \longrightarrow 4\,Fe^{++} + 4\,H^+ + 2O_2$$
$$4\,Fe^{++} + 4\,H^+ + O_2 \longrightarrow 4\,Fe^{+++} + 2H_2O$$

ENZIME AJUTĂTOARE ALE DESMOLIZEI

In afară de enzimele pe care le-am clasificat în cele două grupe mari, hidrolaze şi desmolaze, există o serie de enzime care complectează acţiunea acestora, ca de exemplu *hidrazele, mutazele, liazele, izomerazele, ferazele.*

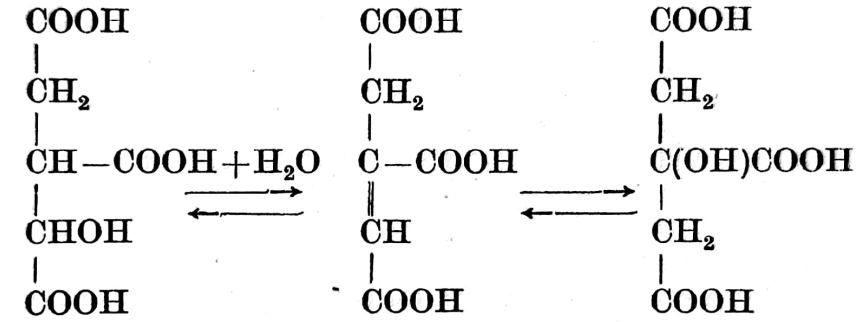
Hidrazele

Hidrazele adiţionează apă la compuşii organici fără a-i scinda. De exemplu **fumaraza** transformă acidul fumaric în acid malic. :



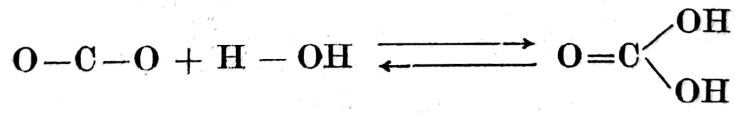
acid malic — acid fumaric

Aconitaza catalizează transformarea acidului izocitric în acid aconitic şi apoi în acid citric :



acid izocitric — acid aconitic — acid citric

Carbonicanhidraza ar putea fi privită ca o hidrază ; are rol important în transportul CO_2 ; catalizează reversibil scindarea acidului carbonic în CO_2 şi H_2O :

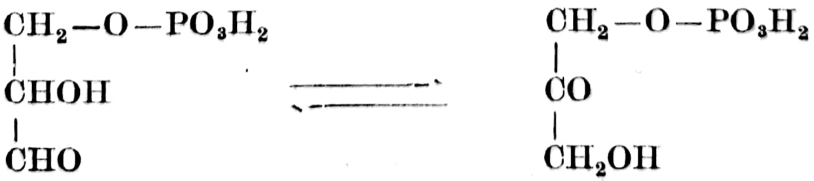


carbonic-anhidraza

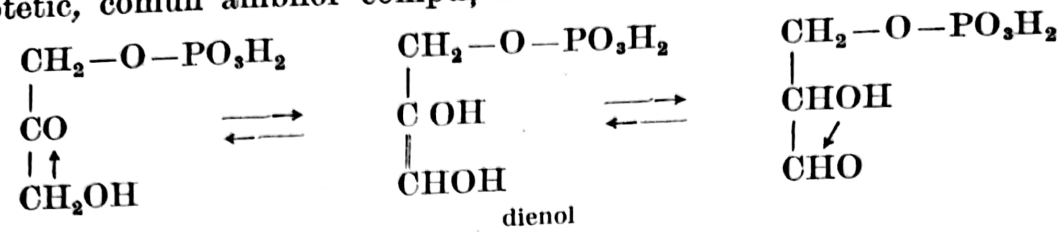
Se găseşte în cantitate mare în eritrocite, de unde a fost preparată. Conţine zinc în moleculă.

Izomerazele

Catalizează reacţiile de izomerizare ale moleculelor. De exemplu *fosfotriozoizomeraza* catalizează reacţia de interconversiune a 3-fosfogliceroaldehidei şi fosfodihidroxiacetonei :

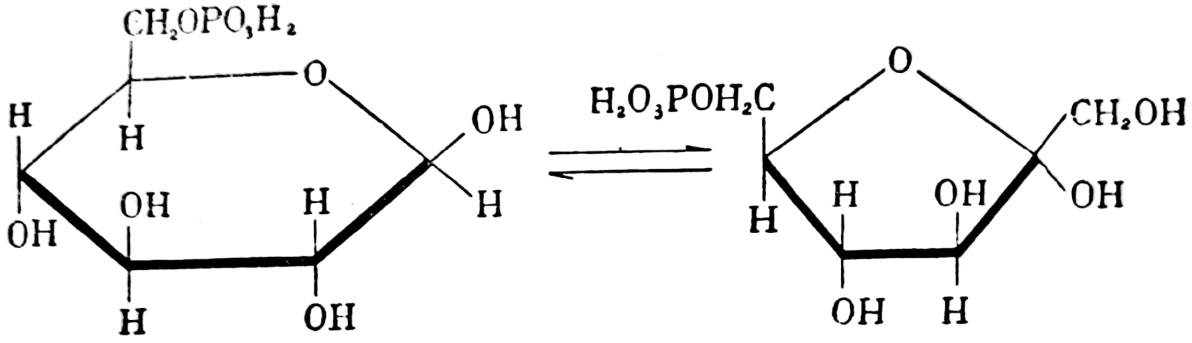


Transformarea se face probabil printr'un stadiu intermediar, de dienol ipotetic, comun ambilor compuşi :



dienol

Oxoizomeraza catalizează interconversiunea glucopiranozo-6-fosfatului şi fructofuranozo-6-fosfatului :

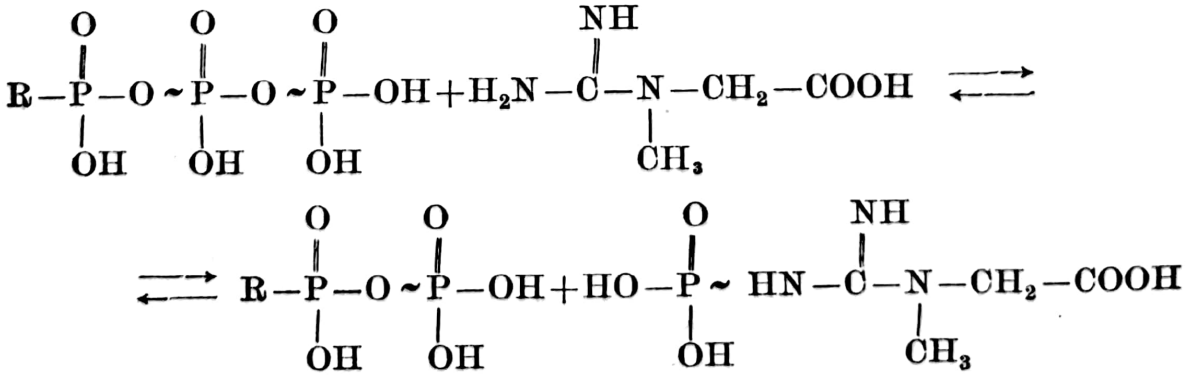


Ferazele

Sunt o clasă importantă de enzime care catalizează transferul unor grupe sau radicali de pe o moleculă pe alta. Potrivit grupării, ele sunt : *transfosfataze, transaminaze, transimidinaze, transmetilaze.*

Transfosfatazele

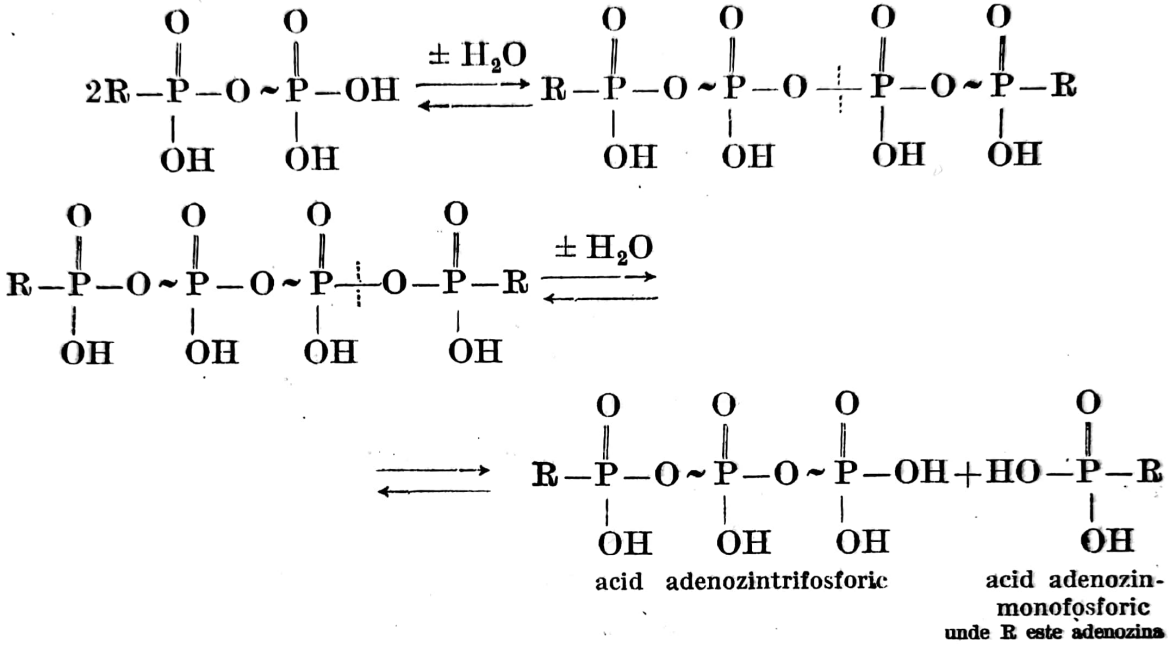
Catalizează transferul radicalilor fosforici între molecule, transportorii de grupări fosfat fiind acizii adenozintrifosforic (ATF) şi adenozindifosforic (ADF). Se mai numesc şi *fosfokinaze,* după numele *hexokinazei,* reprezentantul cel mai cunoscut al acestei clase de enzime. Interesantă este transfosfataza, care catalizează reacţia de transfer de pe adenozintrifosfat (ATF) pe creatină sau de pe creatinfosfat pe adenozindifosfat (ADF), deci transferul grupărilor fosfat puternic energetice care eliberează 10 000—12 000 cal. pentru fiecare gram-mol fosfat.



unde R = radicalul adenozină.

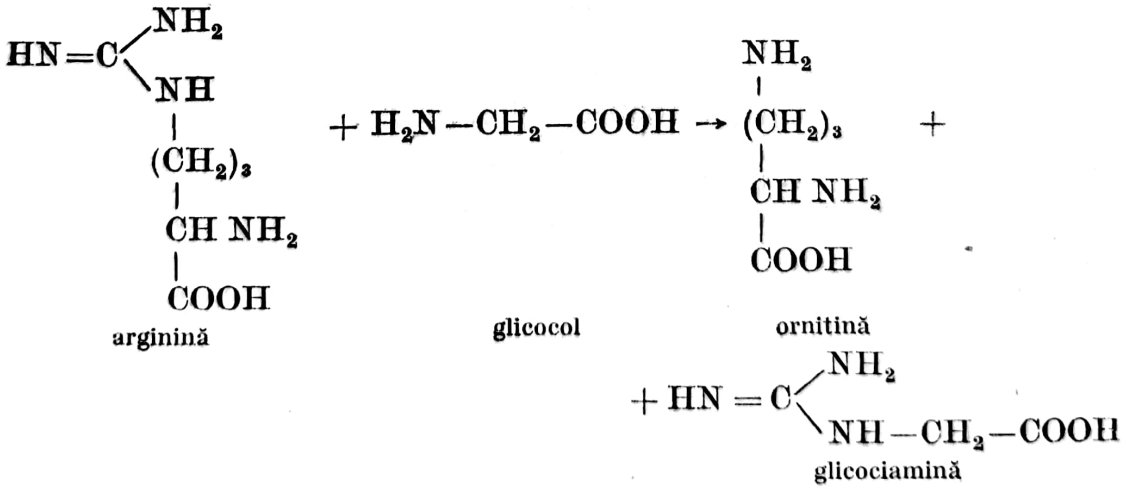
Prin desfacerea radicalului fosfat din creatinfosfat se eliberează aproximativ 10 700 cal. pentru fiecare gram-moleculă fosfat eliberat. Se crede că în această reacţie are loc iniţial o cuplare între ATF şi creatină. Complexul format suferă ulterior o reorânduire intramoleculară şi în urmă hidroliza.

Miokinaza este o fosfokinază importantă care catalizează transferul unui radical fosforic de pe o moleculă de adenozindifosfat (ADF) pe altă moleculă de adenozindifosfat (ADF) cu producere de adenozintrifosfat (ARF) şi adenozinmonofosfat, conform reacţiei :



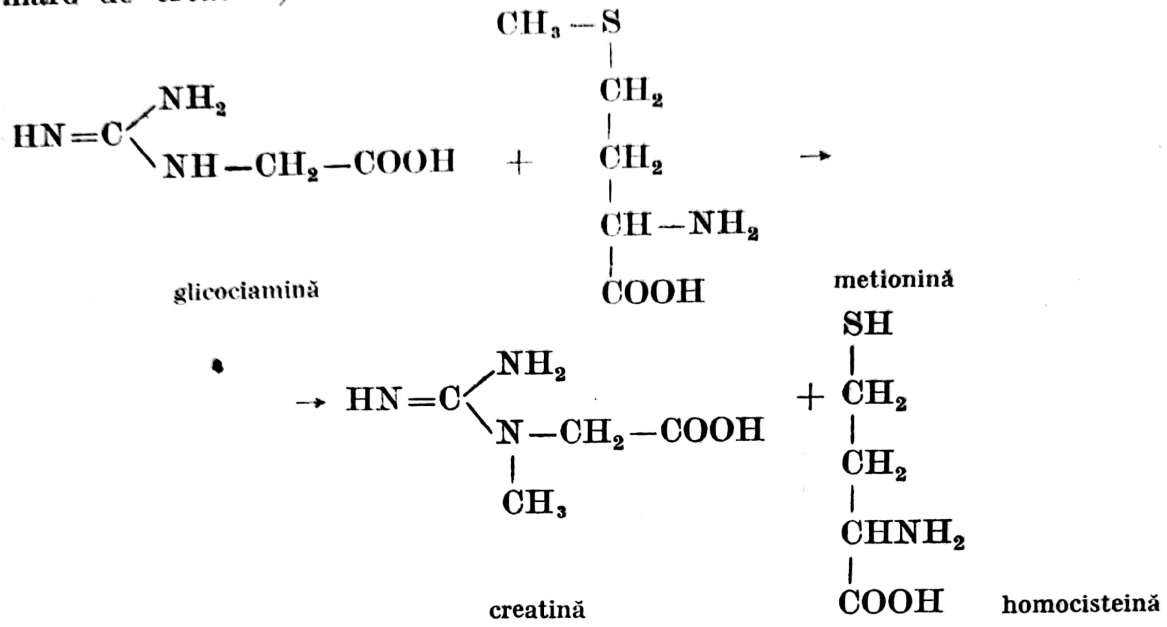
Transamidinazele

Sunt enzimele care catalizează transferul grupării amidinice pe un alt acceptor al acestei grupări, de exemplu, gruparea amidinică a argininei pe glicocol cu formare de (ornitină) şi glicociamină :



Studiul cu izotopi a arătat că această reacţie ar duce la sinteza biologică a creatinei printr'un proces de metilare a glicociaminei, şi anume, prin transmetilare.

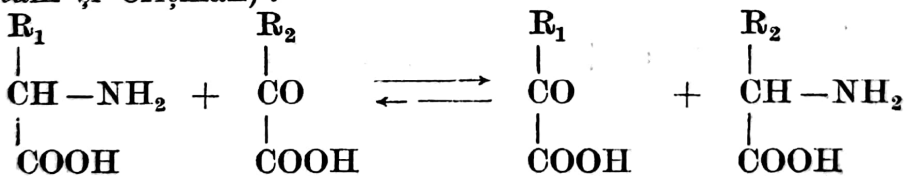
Transmetilarea este reacţia de transport al grupării metilice de pe un acceptor pe un altul. Reacţia este catalizată enzimatic. Cea mai cunoscută reacţie de acest tip este metilarea glicociaminei de către metionină cu formare de creatină, metionina transformându-se în homocisteină :



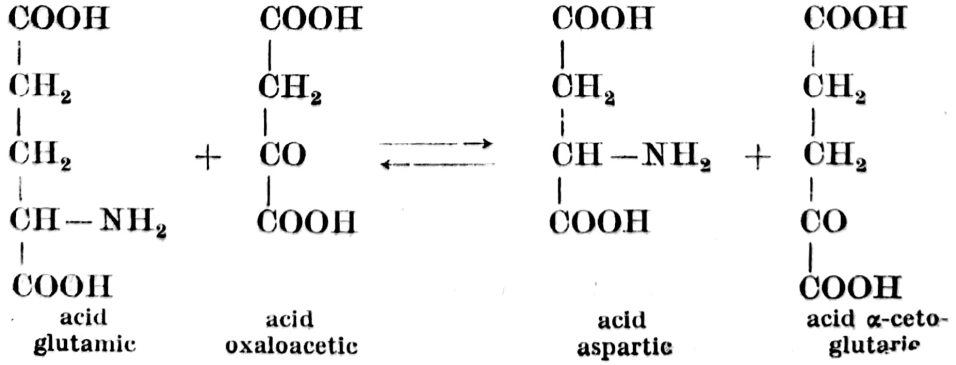
Organismul nu poate sintetiza grupările metilice ; metionina, colina şi betainele ar fi sursa de grupări metilice, cea mai importantă fiind metionina, după cum rezultă din studiul cu izotopi introduşi în gruparea metil (metionina conţine o grupare metil aşa zisă labilă, fixată la S sau N).

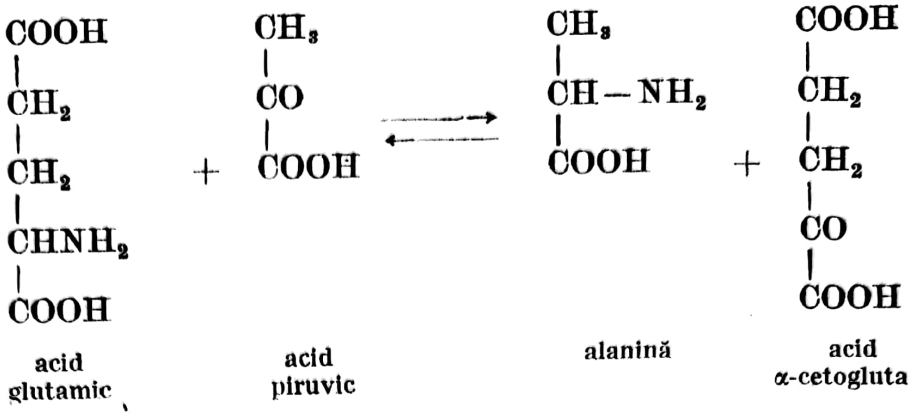
Transaminazele

Sunt aminazele care catalizează reacţiile de transfer al grupării aminice de pe un aminoacid pe un cetoacid. Se mai numesc şi *aminoferaze*. (Braunştain şi Crişman) :



Glutamicoaminoferaza (glutamicotransaminaza) catalizează reacţia reversibilă de transfer al grupării aminice de pe acidul glutamic pe acidul oxaloacetic, cu formare de acid α-cetoglutaric şi acid aspartic sau de pe acidul glutamic pe acidul piruvic cu formare de acid α-cetoglutaric şi alanină :





Enzima foloseşte acidul glutamic ca donator de grupare aminică.

Asparticoaminoferaza (*aspartictransaminaza*) se găseşte în special în plante. Această enzimă catalizează reacţiile de transfer de pe acidul aspartic pe acizii cetonici (acid piruvic), cu formare de alanină şi acid oxaloacetic.

Transaminazele necesită pentru activitatea lor piridoxalfosfat (vitamina B_6), gruparea aldehidică din molecula piridoxalului putând fi înlocuită temporar cu gruparea aminică. Piridoxalul funcţionează astfel ca o coenzimă a transaminazelor în transportul grupării aminice.

Vom reveni cu detalii asupra acestei reacţii importante la capitolul despre metabolismul proteinelor.

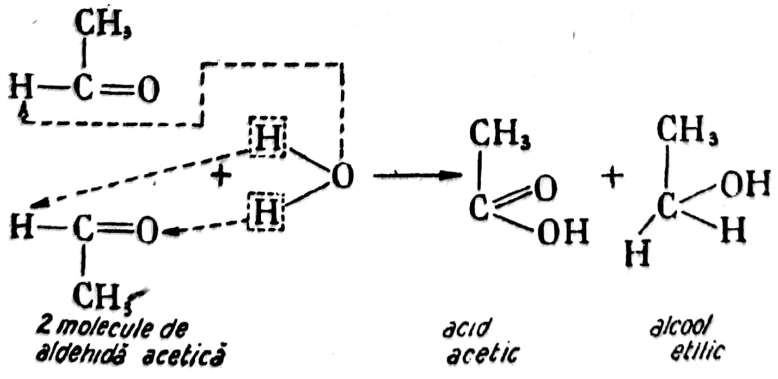
Mutazele

Mutazele adiţionează apa, realizând însă în acelaş timp o oxidare şi o reducere a moleculelor în sensul unei fixări a oxigenului din molecula apei pe una din molecule şi a hidrogenilor pe altă moleculă.

Reacţia de dismutaţie a aldehidelor, cunoscută sub numele de reacţia Cannizzaro, e catalizată de o mutază.

In reacţia Cannizzaro, două molecule de aldehidă se transformă într'o moleculă de acid şi una de alcool.

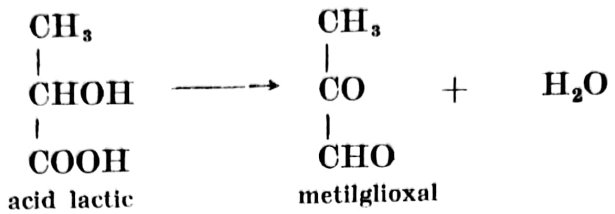
Deci, una din moleculele de aldehidă e oxidată de acidul corespunzător, iar cealaltă e redusă la alcoolul corespunzător conform reacţiei:



O mutază şi, anume o *fosfogliceromutază*, catalizează reacţia de dismutaţie a acidului triozofosforic în acid glicerinofosforic şi acid fosfogliceric, reacţie care are loc în degradarea glucidelor.

Fosfoglucomutaza catalizează reacţia de transformare reversibilă a glucozo-6-fosfatului în α-glucozo-1-fosfat.

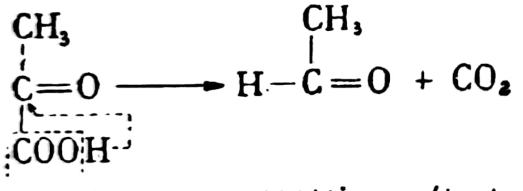
Glioxalaza catalizează dismutația metilglioxalului în acid lactic. Ea poate acționa numai în prezența glutationului (nu și a altor compuși cu sulf).



Carboxilazele

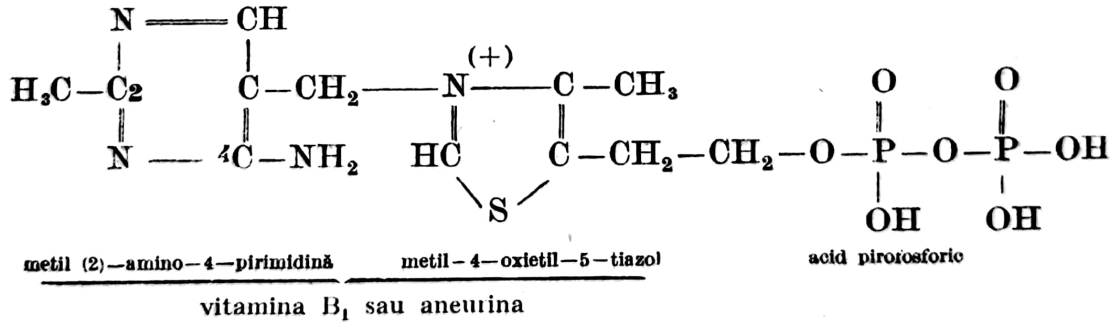
Carboxilazele sunt enzimele care catalizează reacțiile de decarboxilare a acizilor α-cetonici rezultați în cursul dehidrogenărilor succesive ale metabolitelor (sub acțiunea dehidrazelor), fermenților galbeni, citocromilor, citocromoxidazei). Acțiunea carboxilazelor duce la formarea de CO_2, unul din produsele finale ale arderilor (celălalt fiind H_2O).

Carboxilazele sunt formate dintr'o apoenzimă proteinică și o coenzimă activă. Există probabil pentru fiecare substrat o carboxilază specifică. Carboxilaza se găsește în drojdia de bere, în bacterii, în țesuturi animale și vegetale. In drojdia de bere are rolul important de a cataliza reacția de decarboxilare a acidului piruvic în aldehidă acetică și CO_2. Este cea mai bine cunoscută carboxilază:



Coenzima ei așa numită cocarboxilază, este esterul pirofosforic al tiaminei. Se știe că tiamina este identică cu aneurina sau vitamina B_1.

Regăsim deci o vitamină importantă în componența unei enzime. Formula ei este următoarea:



vitamina B_1 sau aneurina

Se știe că vitamina B_1 sau aneurina sau tiamina este o sare cuaternară a tiazolului; conține în moleculă nucleul pirimidinic și nucleul tiazolului. Acidul pirofosforic esterifică gruparea OH din ciclul tiazolului.

Pentru activitatea vitaminei sunt importante grupările NH_2, S și *oxietil*. Legătura dintre apoenzima și coenzima carboxilazei se poate face prin intermediul grupării fosfat sau prin intermediul N din ciclul coenzimei. Magneziul sau manganul sunt necesari pentru acțiunea carboxilazei.

Carboxilaza își exercită acțiunea catalitică printr'un mecanism reversibil de oxidoreducere. Se pare însă că acesta are loc la ciclul tiazolic și

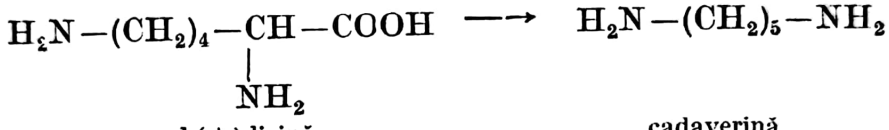
nu la ciclul pirimidinic, şi anume la atomul *S* din gruparea tiazolică sau, mai verosimil, la N pentavalent care, prin trecere în N trivalent, eliberează o valenţă carbonului vecin şi o electrovalenţă oxigenului din gruparea fosforică.

Aminoaciddecarboxilazele

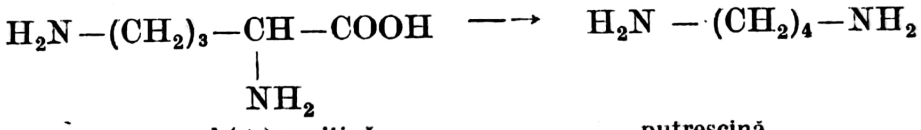
decarboxilează aminoacizii conform reacţiei :

$$\underset{\text{aminoacid}}{R-CH(NH_2)-COOH} \longrightarrow \underset{\text{amină}}{R-CH_2-NH_2} + CO_2 \ .$$

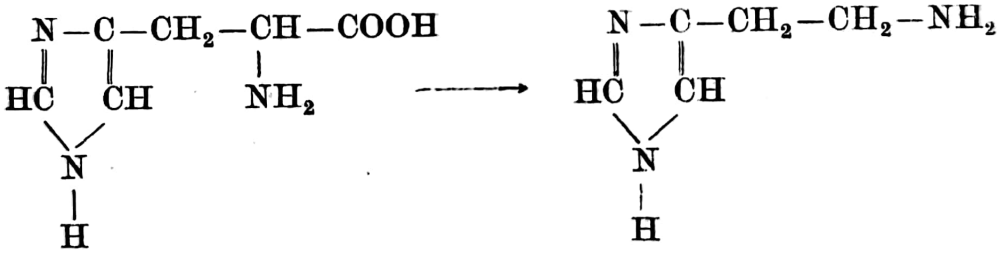
cu formare de amine, unele toxice, altele cu rol biologic important, deşi rezultă din decarboxilarea unor aminoacizi indiferenţi din punct de vedere farmacologic (de exemplu din tirozină → tiramina, din histidină → histamina, din arginină → agmatină, etc.) :



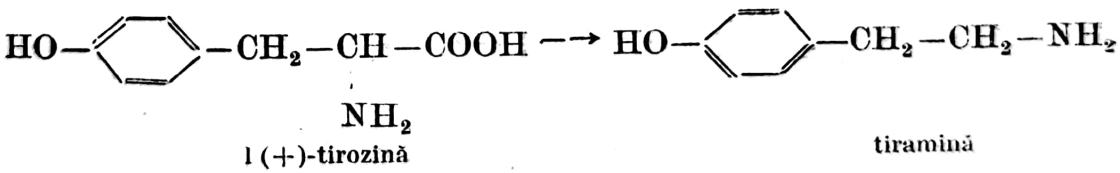
l (+)-lizină — cadaverină



l (+)-ornitină — putrescină



l (+)-histidină — histamină



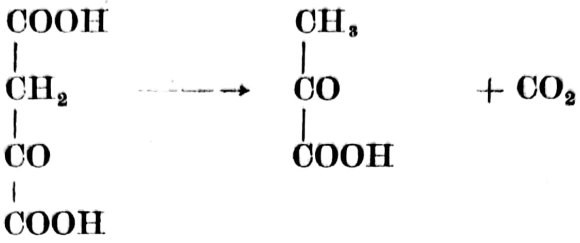
l (+)-tirozină — tiramină

Decarboxilazele animale, vegetale sau bacteriene sunt active numai faţă de aminoacizii seriei *l* şi, deşi lucrează în condiţii caracteristice fiecăreia, produsele reacţiei catalizate sunt identice, indiferent de proveniența enzimei.

Decarboxilazele îşi exercită acţiunea lor catalitică asupra aminoacizilor cu grupările COOH şi NH_2 libere, astfel că metilarea sau acetilarea grupării NH_2, introducerea unei grupări OH micşorează sau suprimă activitatea enzimatică.

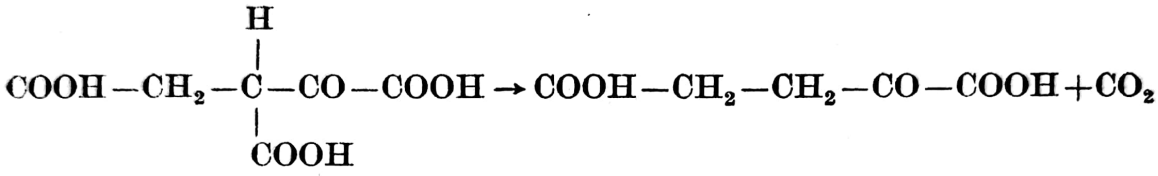
Foarte active sunt mai ales decarboxilazele bacteriene, care, graţie marii lor specificităţi, sunt utilizate în metodele microbiologice pentru dozarea cantitativă a aminoacizilor.

β-carboxilaza decarboxilează acidul oxaloacetic cu formare de acid piruvic :



acid oxaloacetic — acid piruvic

Oxalosuccinicdecarboxilaza decarboxilează acidul oxalosuccinic cu formare de acid α-cetoglutaric, conform reacţiei :

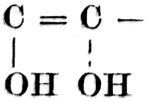


acid oxalosuccinic — acid α-cetoglutaric

TRANSPORTORII DE HIDROGEN NEENZIMATICI

In celule şi ţesuturi există o serie de sisteme chimice dotate cu proprietăţi oxidoreductoare reversibile care, deşi nu au caracter enzimatic, au un rol foarte important în mecanismul oxidărilor biologice.

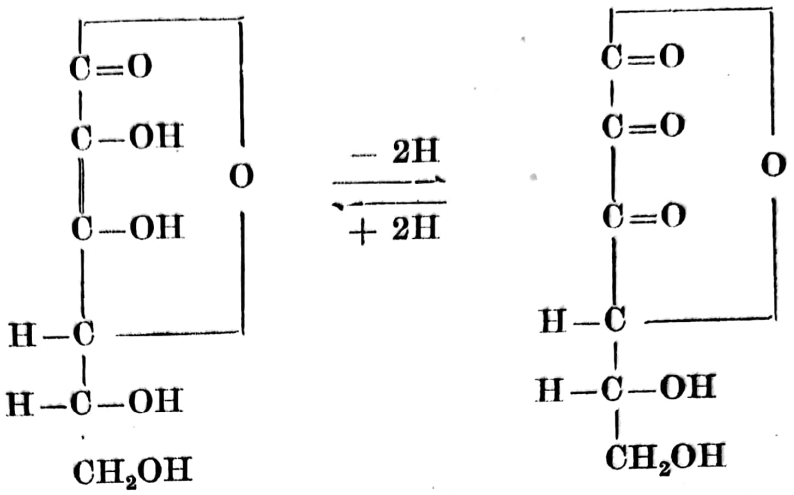
Prin interpunerea lor între diversele sisteme enzimatice stabilesc o legătură continuă între acestea. Este probabil că interpunerea lor e necesară pentru realizarea unei continuităţi gradate între sisteme cu potenţiale de oxidoreducere diferite. Valoarea potenţialului de oxidoreducere condiţionează realizarea unei reacţii date, determinând posibilitatea termodinamică a reducerii, respectiv oxidării unui sistem de către altul. Dintre aceste sisteme oxidoreductoare, neenzimatice, mai cunoscute sunt *acidul ascorbic, acidul dioximaleic, adrenalina, glutationul* şi, în special, *diacizii tetracarbonici*.

Proprietatea acidului ascorbic, dioximaleic, adrenalinei, de a funcţiona ca sisteme oxidoreductoare, este datorită prezenţei în moleculă a grupării dienolice 

care e nestabilă şi trece în grupare cetonică :

forma redusă — formă oxidată

Acidul ascorbic, de exemplu, are această grupare :



acid ascorbic redus

acid ascorbic oxidat sau acid dehidroascorbic

Acidul ascorbic (care se ştie că este identic cu vitamina C) are o mare capacitate reductoare ; are potenţialul de oxidoreducere = + 66 milivolţi şi se crede că prezenţa lui ar determina potenţialul de oxidoreducere al celulelor. De exemplu, potenţialul de oxidoreducere al cristalinului = + 87 milivolţi, în cursul cataractei spontane potenţialul creşte la 113 milivolţi şi acest lucru e întovărăşit de o dispariţie a acidului ascorbic. Deasemenea, la cobai în carenţă de vitamină C, potenţialul de oxido-reducere creşte. E probabil că acidul să constitue un tampon. La plante, acidul ascorbic e substratul oxidazei acid ascorbic — oxidaza.

Glutationul este şi el un transportor neenzimatic de hidrogen. Datorită prezenţei cisteinei în moleculă, el poate funcţiona ca sistem oxidoreductor reversibil, prin trecere dela forma redusă G—SH la forma oxidată G—S—S—G.

Reacţia este :

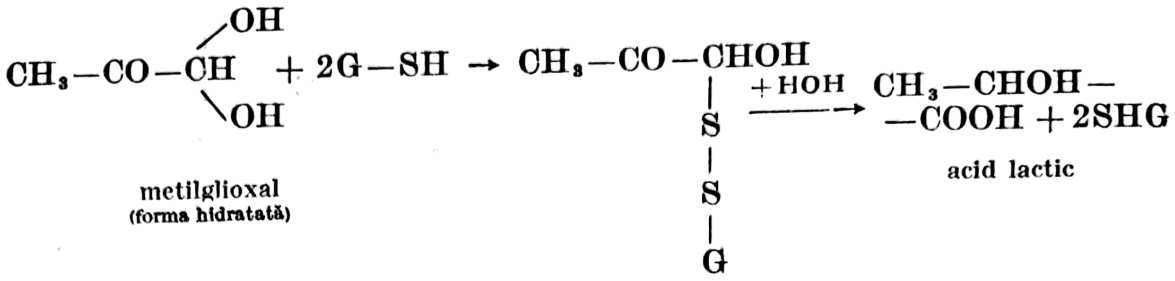
$$2\ G{-}SH \underset{+H_2}{\overset{-H_2}{\rightleftharpoons}} G{-}S{-}S{-}G$$

unde G este radicalul glutation.

Prin acest mecanism, glutationul ar juca rol de transportor de hidrogen. Reacţia de mai sus se petrece continuu în ţesuturi, unde transportul se găseşte sub ambele forme. In boabele de soia predomină forma redusă, ca de altfel în toate ţesuturile foarte active. In ficat şi în ţesuturile tumorilor maligne, forma redusă e în cantitate mai mare decât în ţesuturile normale. Se ştie că intervine ca sistem oxidoreductor în oxidarea glucidelor, a acidului hexozomonofosforic, a celui hexozodifosforic, ca transportor de hidrogen.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru oxidarea metilglioxalului în acid lactic, sub acţiunea catalitică a glioxalazei, prezenţa lui este indispensabilă. Reacţia s'ar petrece astfel:



metilglioxal (forma hidratată)

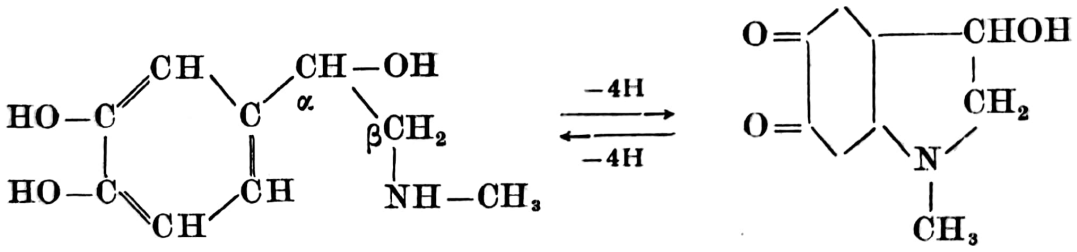
acid lactic

Glutationul intervine în mod obligatoriu în fenomenul contracţiei musculare, cu care ocazie se reduce. Intervine în oxidarea proteinelor, transformând sulfoproteinele reduse în sulfoproteine oxidate: P—SH → P—S—S—P

Intervine în oxidarea lipidelor nesaturate.

Glutationul are rol de activator al multor enzime (proteolitice). Mecanismul ar fi următorul: enzimele care conţin sulf sunt inactive sub forma lor de disulfură — S — S —. Rolul glutationului e tocmai de a transforma gruparea — S — S — în grupare — SH liberă activă. Acţiunea glutationului apare deci ca o reducere şi e probabil că acţiunea lui antitoxică asupra acidului cianhidric, arsenicului, veninului de cobra, e bazată pe un mecanism analog.

Adrenalina ar putea servi ca transportor de hidrogen în oxidările biologice prin trecere în *adrenocrom*:



adrenalină

adrenocrom

Are $E_1 = 0{,}370$ volţi la pH = 7.

Această transformare poate avea loc sub acţiunea tirozimazei, adrenocromul este fiziologic inactiv.

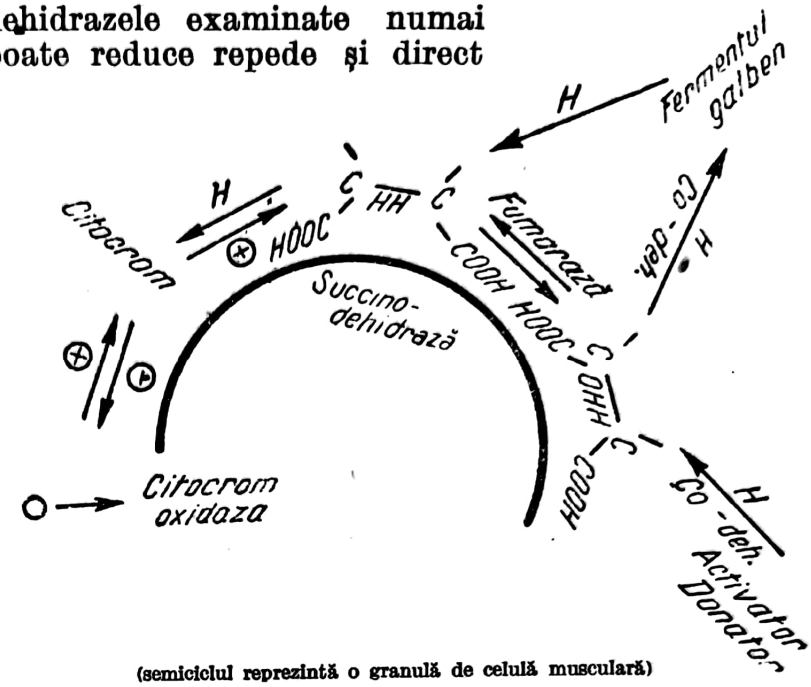
Diacizii tetracarbonici

După Szent-Györgyi, diacizii în C_4 intervin ca sisteme oxidoreductoare foarte importante în lanţul oxidărilor celulare. Aceste sisteme sunt: *acid fumaric* ⇄ *acid succinic* şi *acid oxalacetic* ⇄ *acid malic*.

Aceşti acizi apar în mod normal în celule ca produse de degradare ale glucidelor şi proteinelor, iar parte din ei sunt utilizaţi în ţesuturi pentru a transforma catalitic hidrogenul, făcându-l capabil să se combine cu oxigenul (fig. 96).

Argumentele care l-au făcut pe Szent-Györgyi să atribue *acidului fumaric, respectiv succinic* şi ulterior acidului malic acest rol sunt următoarele:

1. Dintre toate dehidrazele examinate numai *dehidraza succinică* poate reduce repede şi direct citocromul C. Ea labilizează 2 atomi de hidrogen din acidul succinic, hidrogeni pe care îi poate fixa citocromul (redus). Acidul succinic redus e transformat reversibil în acid fumaric; acesta, la rândul său, poate fixa alţi 2H de pe substrat, trecând din nou în acid succinic, şi aşa mai departe. Astfel, acidul succinic şi acidul fumaric sunt transportori de hidrogen pe sistemul citocromic.



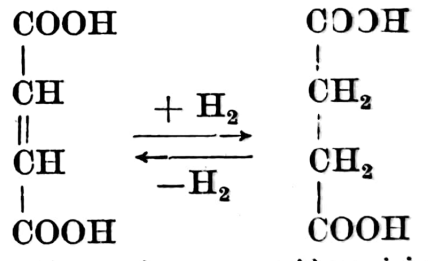
(semicicluł reprezintă o granulă de celulă musculară)

Fig. 96. Schema respiraţiei celulare după Szent-Györgyi

2. Succinodehidraza care catalizează această reacţie reversibilă de trecere a acidului succinic în acid fumaric este prezentă în toate ţesuturile animale, în levuri şi reacţionează cu o viteză comparabilă cu viteza respiraţiei în ţesuturi.

3. Adăugarea de acid fumaric ţesuturilor face să crească mult respiraţia acestora, chiar dacă e adăugat în cantităţi mici; deci intervine în oxidările celulare.

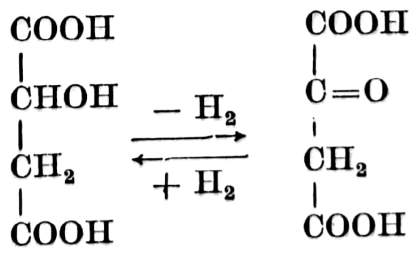
4. Respiraţia ţesuturilor e inhibată de *acidul malonic* care este un inhibitor cunoscut al succinodehidrazei.



acid fumaric — acid succinic

După Szent-Györgyi, aceste argumente ar pleda pentru intervenţia sistemului oxidoreductor al diacizilor în C_4 între substratul nutritiv şi citocrom. Acest sistem este termodinamic posibil.

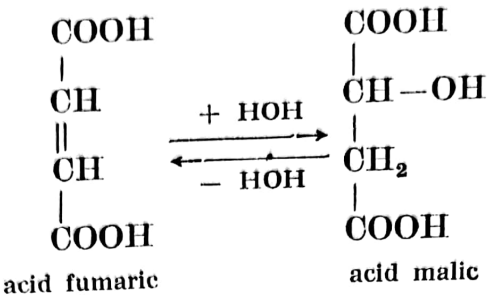
Alte fapte pledează însă pentru intervenţia şi a altui sistem de diacizi tetracarbonici în această fază a oxidărilor celulare, şi anume, a *sistemului acid malic — acid oxaloacetic*:



acid malic — acid oxaloacetic

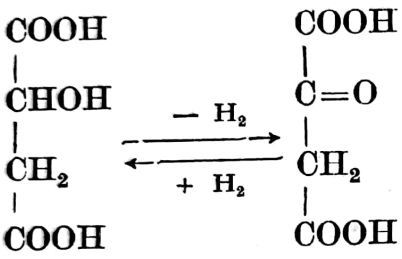
Aceste fapte sunt următoarele :

1. In toate celulele există o enzimă, *fumaraza*, foarte activă, care catalizează transformarea prin hidratare a acidului fumaric în acid malic. Reacţia este perfect reversibilă :



acid fumaric — acid malic

2. Acidul malic e repede transformat sub acţiunea catalitică a unei dehidraze, *malicodehidraza*, în acid oxaloacetic ; reacţia e perfect reversibilă :



acid malic — acid oxaloacetic

3. Acidul oxaloacetic este foarte repede redus de către ţesuturile cu o viteză mare de oxidaţie (de exemplu, de ţesuturile musculare, cu o viteză comparabilă cu aceea a respiraţiei totale).

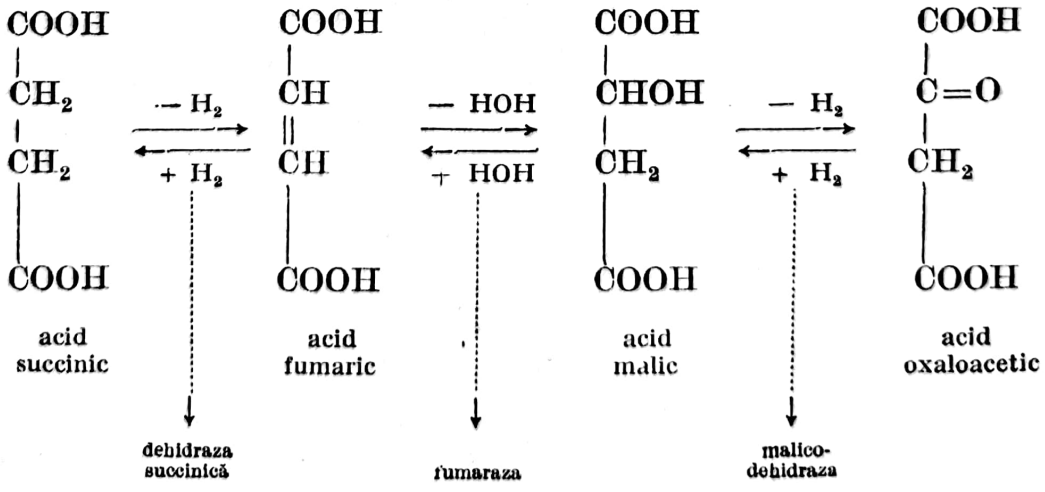
4. Excesul de acid succinic înlătură acţiunea inhibitoare a malonatului, ceeace demonstrează că malonatul inhibează transformarea reversibilă a acidului fumaric în acid succinic. Deaceea, adăugarea de acid succinic suprimă această acţiune ; făcând posibilă transformarea în acid malic.

5. Acidul malic e repede transformat în acid oxaloacetic sub acţiunea reversibilă a unei dehidraze specifice.

6. Acidul oxaloacetic e repede redus de ţesuturi.

7. Acidul succinic e rapid oxidat în acid fumaric de către sistemul *citocrom-citocromoxidază* şi numai dehidrogenaza succinică poate reduce sistemul citocrom-citocromoxidază ; e deci strict specifică.

Rolul fumarazei în acest lanţ de reacţii este de a menţine echilibrul adecvat între sistemele celor 4 acizi în C_4 :



Acest lanţ de reacţii este termodinamic posibil, fapt indicat de valorile potenţialelor de oxidoreducere ale sistemelor componente.

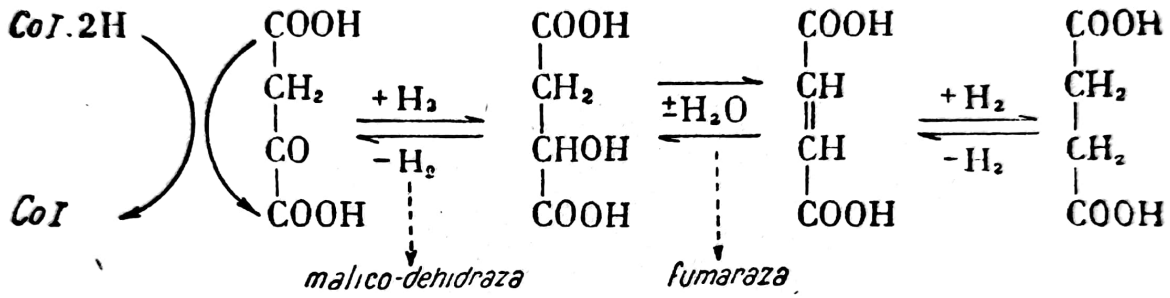
Sistemul acid malic-dehidrogenaza-acid oxaloacetic are $E_0 = -0{,}102$ volţi la pH = 87 şi 38°.

Sistemul succinat — dehidrogenază-fumarata are $E_0 = +0{,}015$ V la pH = 6,9 şi 30°.

Sistemul citocrom C-citocrom-C-redus are $E_0 = +0{,}262$ V la pH = 5—8 şi 30°.

Sistemul malat-oxaloacetat va reduce sistemul succinat-fumarat şi acesta va reduce sistemul citocrom C; el poate primi însă direct hidrogenul din sistemul citocrom-citocromoxidază, restabilind astfel reoxidarea acidului fumaric în acid succinic, fără intervenţia altui mediator.

Sistemul succinic nu necesită coenzime, dar sistemul malic necesită coenzima CoI. Cu intervenţia ei, lanţul de reacţii capătă următorul aspect:



Sistemul coenzima I — Coenzima I redusă are potenţialul de oxidoreducere — 0,282 V (pH 7,0, 30°).

MECANISMUL OXIDĂRILOR CELULARE

Oxidarea moleculelor organice din substanţele nutritive (glucide, lipide, protide) este sursa de energie necesară vieţii celulare. Oxidarea celulară este mecanismul fundamental prin care energia potenţială acumulată în substanţele organice este eliberată şi pusă la îndemâna celulei pentru realizarea travaliului ei (osmotic, muscular, de sinteză, etc.).

Orice funcţie celulară, oricare ar fi ea, consumă energie şi această energie este procurată de reacţiile de degradare oxidativă a substanţelor organice nutritive. Cele două componente fundamentale ale reacţiilor de oxidare biologică sunt moleculele organice din alimente şi oxigenul. Celulele aerobe consumă oxigenul molecular atmosferic, cele anaerobe oxigenul din compuşi; primele celule respiră, celelalte fermentează; deosebirea dintre ele o face nivelul potenţialului lor de oxidoreducere, mecanismul fundamental al reacţiei fiind acelaş în ambele procese.

Moleculele organice din alimente sunt constituite din C, H, O, N, S, etc., elemente care intră în constituţia glucidelor, lipidelor şi protidelor de diverse tipuri. Moleculele complexe sunt degradate iniţial pe cale hidrolitică în moleculele mai simple prin acţiunea catalitică a hidrolazelor: polizaharidele în monozaharide, lipidele în acizi graşi şi glicerol, protidele în acizi aminaţi. Degradările acestea hidrolitice nu sunt importante din punct de vedere energetic, deoarece eliberează cantităţi foarte mici de energie utilă. Degradarea ulterioară a acestor molecule mici, a aşa numi-

telor metabolite, care se face pe cale oxidativă sub acțiunea catalitică a desmolazelor, constitue sursa importantă de energie pentru celulă. Aceste reacții se petrec cu variații mari de energie. Produsele finale ale degradării oxidative sunt CO_2 și H_2O, produse identice cu acelea ale arderii oricărei substanțe organice în cuptorul de combustie. Acest lucru a făcut pe Lavoisier să considere oxidările în organismul viu ca arderi simple, în care oxigenul molecular se unește direct cu carbonul din compușii organici și hidrogenul cu oxigenul.

Dar între arderea în cuptorul de combustie și oxidările în organism, sunt diferențe în ceeace privește condițiile de realizare, deși produsele finale sunt identice. Celulele ființelor aerobe își iau oxigenul necesar oxidărilor din atmosferă prin fenomenul respirației. Din aerul alveolar, care are o compoziție foarte apropiată de aceea a aerului atmosferic, oxigenul trece în sânge, e disolvat în plasma sanguină sub formă de oxigen molecular și trece prin membrana globulului roșu în interiorul lui. Din plasma sanguină, oxigenul trece în apa din celulă și e utilizat pentru diversele oxidări celulare. Din cauza solubilității mici a oxigenului în plasmă, aceasta nu poate conține toată cantitatea de oxigen necesară oxidărilor. Hemoglobina are în acest sens un rol fundamental, grație capacității ei de a fixa labil și reversibil oxigenul molecular sub formă de HbO_2 și de a-l ceda cu ușurință, punând la îndemâna celulelor, ori de câte ori e nevoie, oxigen liber, conform reacției : $HbO_2 \rightleftarrows Hb + O_2$.

In fiecare moment există un echilibru între acești doi termeni ai reacției și, pe măsură ce oxigenul molecular e consumat, în aceeași măsură HbO_2 se disociază. Hb e astfel vectorul oxigenului molecular. In celulă, însă, numai faza finală a oxidărilor utilizează oxigenul molecular. Ciclul oxidărilor celulare cuprinde două faze : o *fază anaerobă* sau *anoxibiotică* și o fază *aerobă* sau *oxibiotică*.

Faza *aerobă* începe în plămân, unde intervine primul sistem oxidoreductor reversibil : $HbO_2 = HB + O_2$. Din plămân trece în capilarele arteriale, din capilarele arteriale în spațiile lacunare, în țesutul conjunctiv, unde întâlnește diversele sisteme oxidoreductoare reversibile, fermentul respirator, citocromii care fixează oxigenul ; până în acest moment vorbim de faza de oxidare aerobă. In acest punct se întâlnește cu ultimele produse ale degradării oxidative anaerobe, a metabolitelor, degradare realizată cu ajutorul altor sisteme oxidoreductoare reversibile, dehidraze, ferment galben, codehidraze, transportori de hidrogen neenzimatici, citocromi, care fac parte din componentele celulare. In urma acestor două faze rezultă oxidarea metabolitelor de către oxigenul molecular.

Produsele finale ale degradării oxidative în celule sunt CO_2 și H_2O. Ar trebui deci, ca formarea acestor compuși finali să degajeze energia utilizată de celulă pentru realizarea funcțiilor ei. Se știe că în mașina cu vapori căldura eliberată în reacția de ardere a carbonului de către oxigenul molecular se transformă în alte forme de energie ; această reacție se petrece într'adevăr cu degajare mare de energie calorică. Trebue să precizăm însă dela început — și este marele merit a lui Wieland de a fi relevat acest lucru — că, în organismul viu, CO_2, produsul final al oxidărilor celulare, *nu e rezultatul unei oxidări directe a carbonului din substrat de către oxigenul molecular, ci provine din acest substrat prin dehidrogenări succesive.* Locul hidrogenului desfăcut din molecula organică e luat de elementele apei, și printr'o serie de procese succesive de dehidrogenare

Schema oxidării celulare

Intervenția sistemelor oxidoreductoare enzimatice și neenzimatice

1) $SUBSTRAT\begin{matrix}H\\H\end{matrix}$ + COENZIMA II → SUBSTRAT (oxidat) + DIHIDROCOENZIMA II

(+ dehidraza)

2) DIHIDROCOENZIMA II + ACID OXALOACETIC → ACID MALIC + COENZIMA II
(HOOC—CO—CH_2—COOH) (HOOC—CHOH—CH_2—COOH)

(+ malicodehidraza)

3) ACID MALIC + COENZIMA II → ACID OXALOACETIC + DIHIDROCOENZIMA II

4) DIHIDROCOENZIMA II + FERMENT GALBEN (sau diaforaza) → LEUCOFERMENT + COENZIMA II

5) LEUCOFERMENT + ACID FUMARIC → ACID SUCCINIC + FERMENT GALBEN
(HOOC—CH = CH—COOH) (HOOC—CH_2—CH_2—COOH)

6) ACID SUCCINIC + CITOCROM *b* F^{+++} → ACID FUMARIC + CITOCROM *b* Fe^{++} + $\boxed{2H+}$

(+ succinodehidraza)

7) 2 CITOCROM *b* Fe^{++} + 2 CITOCROM *c* Fe^{+++} → 2 CITOCROM *c* Fe^{++} + 2 CITOCROM *b* Fe^{+++}

8) 2 CITOCROM *c* Fe^{++} + 2 CITOCROM *a* Fe^{+++} → 2 CITOCROM *a* Fe^{++} + 2 CITOCROM *c* Fe^{+++}

9) 2 CITOCROM *a* Fe^{++} + 2 W Fe^{+++} → 2 W Fe^{++} + 2 CITOCROM *a* Fe^{+++} (reacția inhibată de CNK)

10) 2 W Fe^{++} + $\frac{1}{2}$ O_2 → 2 W Fe^{+++} + O^{--} (reacția inhibată de CO)

11) O^{--} + 2 H^{+} → H_2O

Sau reacțiile

12) 2 W Fe^{++} + O_2 → 2 W Fe^{+++} + 2 O^{--}

13) 2 O^{--} + 2 H^{+} → H_2O_2

cu formare de apă oxigenată (în acest caz intervine catalaza sau peroxidaza).

Scanned with OKEN Scanner

și hidratare, molecula organică devine din ce în ce mai săracă în hidrogen și din ce în ce mai bogată în oxigen, astfel că în cele din urmă nu rămâne decât CO_2, al cărui oxigen nu provine din oxigenul molecular, ci din apa în care se găsesc aceste molecule organice. Se poate reda schematic acest lucru astfel:

$$CH_2-CH_2 \xrightarrow{-H_2} CH=CH \xrightarrow{+HOH} CH_2-CHOH \xrightarrow{-H_2}$$

$$CH=COH \xrightarrow{+HOH} CHOH-CHOH \xrightarrow{-H_2} CHOH-C=O \xrightarrow{+H_2O}$$

$$\begin{matrix} COOH \\ | \\ COOH \end{matrix} \longrightarrow 2CO_2$$

Dar aceste dehidrogenări și hidratări succesive, care duc astfel la unul din produsele finale ale oxidărilor celulare, nu se petrec cu eliberare de energie, ci, dimpotrivă cônsumă energie. Ele nu pot constitui deci sursa energetică a celulei. Aceasta rezultă din formarea celuilalt produs final al oxidărilor celulare, și anume, a H_2O. Intr'adevăr, reacția $2H + \frac{1}{2}O_2 = H_2O$ este o *reacție puternic exotermă*. Combinarea unui *mol hidrogen* cu *oxigenul molecular* degajează *68 calorii mari* și această energie este utilizată de celule ca *sursă de energie*.

Problema care se pune însă este următoarea. Organismul viu nu poate transforma, ca o mașină termică, energia calorică în alte forme de energie și atunci ar însemna ca această energie care se degajează din combinarea unui mol de hidrogen cu oxigenul molecular, să fie pierdută în cea mai mare măsură pentru organism. Or, acest lucru nu se întâmplă în realitate și explicația este următoarea: această reacție este împărțită în celule într'un șir de reacții intermediare, care fac ca energia eliberată să nu fie degajată dintrodată sub formă de căldură și risipită, ci sub o formă capabilă de a fi utilizată imediat ca atare. Prin activitatea coordonată a multiplilor catalizatori enzimatici este menținută perfectă coordonarea reacțiilor chimice care constitue întregul metabolism celular. Studiul detaliat al acestor reacții ne va lămuri acest lucru.

Ca sursă a energiei celulare apare deci oxidarea hidrogenului din substrat de către oxigenul molecular, respectiv a moleculelor organice din alimentație de către oxigenul molecular. Aceste molecule sunt însă stabile; monozaharidele, acizii grași, aminoacizii, pentru a fi oxidați în laborator de către oxigenul molecular la CO_2 și H_2O, cer condiții de presiune, de temperatură și de durată incompatibile cu viața celulară. Ele rezistă în condiții normale nu numai oxigenului molecular, dar și oxidanților puternici (permanganat de potasiu, acid azotic, etc.). Aceleași molecule în organismul viu sunt oxidate însă rapid în condițiile normale de temperatură și presiune. Explicația o găsim în faptul că aici există *catalizatorii* care accelerează viteza de reacție dintre moleculele organice și oxigenul molecular. Cum lucrează acești catalizatori? Știm că pentru ca o reacție între doi compuși *A* și *B* să se poată realiza trebue ca moleculele *A* și *B* să aibă un anumit nivel de energie, numit nivel de energie critică. Valoarea acestuia însă va fi cu atât mai mică cu cât moleculele *A* și *B* care reacționează vor avea o mobi-

litate mai mare, vor fi deci mai labile. Acțiunea catalizatorilor este astfel tocmai aceea de a coborî nivelul potențialului critic de reacție printr'o labilizare a moleculelor care trebue să reacționeze. In cazul oxidărilor celulare, reacția importantă este combinarea H_2 cu $\frac{1}{2}$ O_2, deci componentele care trebue labilizate sunt hidrogenul molecular organic din alimentație și oxigenul atmosferic.

Problema care se pune acum e care sunt aceste treceri succesive, care să ducă fie la activarea hidrogenului, fie la aceea a oxigenului, fie a amândorura, așa fel încât să devină capabili de a se combina între ei. Există mai multe teorii în ceeace privește felul acestei labilizări, și anume : teoria lui Warburg, teoria lui Wieland și teoria lui Keilin — Szent-Györgyi.

1. **Teoria lui Warburg** admite ca *necesară și suficientă numai activarea oxigenului molecular pentru a se putea uni direct cu hidrogenul substratului*. După Warburg, combinația dintre hidrogenul substratului și oxigenul molecular trebue să fie precedată de o *activare a oxigenului*, care este realizată de către *fermentul respirator* (WFe^{++}). Datorită prezenței fierului în molecula lui, acesta poate juca rol de transportor de electroni și deci poate interveni prin acest mecanism în oxidările celulare. Fierul bivalent (fero) din molecula fermentului poate ceda cu ușurință și în mod reversibil electronul lui oxigenului molecular; prin aceasta, atomul de oxigen inert e transformat în ion de oxigen activ :

Reacția ar fi următoarea :

$$2\,W\,Fe^{++} + \tfrac{1}{2}O_2 = 2\,W\,Fe^{+++} + O^{--}$$

($-2e$)

Prin cedarea unui electron, fermentul respirator redus e transformat în ferment respirator oxidat care, pentru a putea interveni din nou în activarea oxigenului, trebue să fie din nou redus. Warburg admite că regenerarea fermentului respirator, redus nu se poate face direct de către hidrogenul substratului, ci numai prin intermediul altui catalizator intermediar, și anume al citocromilor *a*, *b* și *c*, printr'o reducere în lanț în raport cu potențialele lor de oxidoreducere.

Citocromul redus, conținând gruparea fero în moleculă, va ceda un electron fermentului respirator oxidat, care conține Fe^{+++}, și îl va transforma în ferment respirator redus, care va putea din nou funcționa ca activator al oxigenului molecular. Avem deci schematic următoarele cupluri de reacții care duc la activarea oxigenului după Warburg :

$$2\,Cit.\,Fe^{++} + 2\,W\,Fe^{+++} \longrightarrow 2\,Cit.Fe^{+++} + 2\,W\,Fe^{++}$$

($-2e$)

$$2\,W\,Fe^{++} + \tfrac{1}{2}O_2 \rightarrow 2\,W\,Fe^{+++} + O^{--}$$

($-2e$)

Acest oxigen activat se va uni direct cu hidrogenul substratului. Argumentul care l-a făcut pe Warburg să atribue rolul fundamental în oxidarea celulară activării oxigenului prin acțiunea catalitică a fermentului respirator era faptul că inhibitorii fermentului respirator (CNK, CO, NA_3N) inhibă și respirația celulară. Dar e de remarcat că numai 60% din

respirația celulară e inhibată de aceştia, deci 40% trebue să se petreacă pe altă cale.

2. **Teoria lui Wieland** admite ca necesară şi suficientă pentru combinarea hidrogenului din molecula metabolitului cu oxigenul *numai activarea hidrogenului*, socotind *oxigenul ca un acceptor final în seria oxidărilor aerobe*, el putând fi înlocuit prin orice alt acceptor în fazele intermediare anaerobe.

Pentru Wieland, oxidările celulare sunt de fapt dehidrogenări. Dehidrogenările necesită însă labilizarea hidrogenului cu ajutorul enzimelor specifice, al dehidrazelor.

După Wieland, pentru ca o dehidrogenare să poată avea loc trebue să existe în sistem : 1) un donator de hidrogen, 2) o enzimă capabilă de a activa acest hidrogen (o dehidrază) şi 3) un acceptor al hidrogenului activat. Acest acceptor poate ceda mai departe hidrogenul primit şi în acest caz e un transportor de hidrogen sau un acceptor intermediar.

In cazul oxidărilor celulare aerobe, acceptorul final al hidrogenului va fi oxigenul, dar, după Wieland, nu oxigenul molecular gazos, ci oxigenul din molecula apei în care se găseşte metabolitul ce a cedat hidrogenul; în cazul oxidării anaerobe, va fi însă un acceptor oarecare.

Teoria lui Wieland explică foarte multe fenomene ce se petrec în cursul oxidărilor celulare, explică inhibarea totală a oxidărilor sub acțiunea uretanelor (care, se ştie, inhibă dehidrazele), dar nu explică inhibarea a 60% din respirație sub acțiunea CNK, care e explicată de teoria lui Warburg.

O teorie care le îmbină pe amândouă şi explică toate contradicțiile acestora este :

3. **Teoria dublei activări a lui Keilin**, teorie care a fost ulterior *complectată de Szent-Györgyi.*

După Keilin, contradicțiile fiecăreia din teoriile de mai sus pot fi înlăturate dacă se admite că în oxidările celulare are loc atât o activare a oxigenului molecular prin sistemul enzimatic al lui Warburg, prin oxidaze, cât şi o activare a hidrogenului din substrat prin sistemele enzimatice ale lui Wieland, prin dehidraze.

Foarte schematic, oxidarea biologică se poate reda după Keilin în felul următor :

$$O_2 \longrightarrow 2\,O^{--} \longrightarrow 2H_2O \longleftarrow 4H^{+} \longleftarrow SH^2$$

activat de oxidaze (inhibat de CNK, CO) — oxigen activat — activat de dehidraze (inhibat de uretane)

Imaginea aceasta este însă extrem de schematică, deoarece activarea oxigenului şi a hidrogenului se face printr'un lung şir de catalizatori intermediari, care conlucrează în a-i labiliza în aşa măsură încât combinarea lor să se poată face în condiții fiziologice.

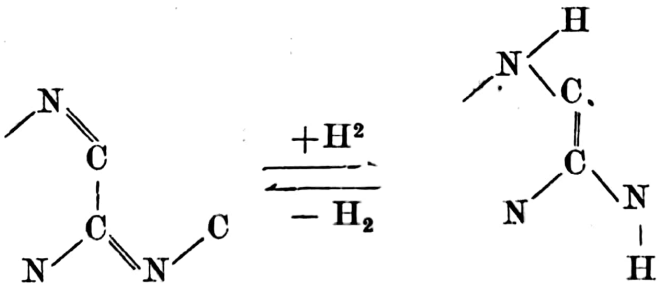
Am descris un întreg şir de catalizatori enzimatici, de transportori de hidrogen şi electroni. Ei sunt tocmai aceia care intervin în labilizarea hidrogenului din substrat şi a oxigenului molecular. Să vedem acum care este înlănțuirea lor şi ce determină poziția lor în lanțul care duce la reacția finală de combinare a hidrogenului cu oxigenul, sursa energetică principală în organism.

Scanned with OKEN Scanner

Specificitatea enzimelor şi în special a dehidrazelor, pe de o parte, şi cunoaşterea potenţialului de oxidoreducere al diverselor sisteme enzimatice pe de altă parte, au permis stabilirea seriei de transportori de hidrogen şi de electroni din lanţul oxidării celulare. Se crede că seria ar fi următoarea :

a) *Hidrogenul substratului e activat iniţial de dehidraze specifice fiecărui substrat în parte* (lactico-alcoolicodehidrază), specificitate condiţionată de *apodehidrază*, care stabileşte legătura cu substratul. *Codehidraza*, prin gruparea ei funcţională, N din ciclul piridinic care poate trece din N pentavalent în N trivalent, fixează reversibil hidrogenii substratului, trecând în *dihidrocodehidraza*. Dihidrocodehidraza, nefiind autooxidabilă, nu poate ceda direct hidrogenii oxigenului molecular, ci unui alt catalizator intermediar, şi anume fermentului galben al lui Warburg.

b) *Fermentul galben oxidat poate fixa hidrogenul labilizat de pe dihidrocodehidrază* datorită grupării sale active din molecula izoaloxazinei, care conţine 2 N legaţi prin legături duble conjugate. Aceste legături se desfac eliberând valenţele ce pot fixa hidrogenii de pe dihidrocodehidrază, regenerând codehidraza :



Fermentul galben redus prin fixarea hidrogenului îl poate ceda oxigenului molecular. Reacţia este termodinamic posibilă, dar este atât de lentă încât, acesta fiind autooxidabil, e probabil că nu se petrece în mod obişnuit. Ea poate însă explica persistenţa a 40% din oxidarea celulară după inhibare cu CNK.

c) In general, *fermentul galben redus de dihidrocodehidraza transmite hidrogenul labilizat* altui acceptor intermediar, şi anume *citocromilor*, dar nu direct, ci, după cum a arătat Szent-Gyorgyi, *prin intermediul diacizilor tetracarbonici* sau diacizilor în C_4, care formează sistemul acid oxalacetic ⇄ ⇄ acid malic şi sistemul acid fumaric ⇄ acid succinic. Am văzut care sunt faptele experimentale care l-au făcut pe Szent-Györgyi să atribue acestor acizi un rol important în ciclul oxidării celulare de transportori de hidrogen labilizat dela substrat la citocromi :

— existenţa unei dehidraze succinice foarte active în toate ţesuturile ;

— dehidraza succinică împreună cu substratul ei specific, acidul succinic, este singurul sistem care poate reduce direct citocromul ; nicio altă dehidrază nu are această însuşire ;

— existenţa fumarazei care transformă acidul fumaric în acid malic ;

— existenţa unei malicodehidraze active care transformă acidul malic în acid oxaloacetic ;

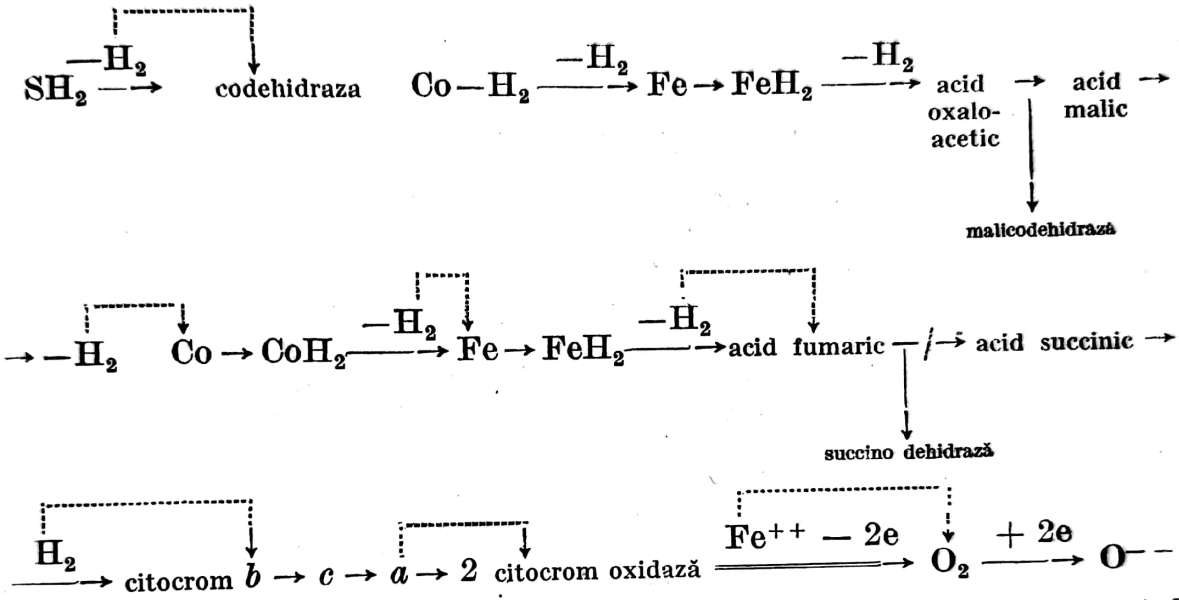
— reducerea rapidă a acidului oxaloacetic în toate ţesuturile.

Szent-Györgyi mai admite că între cele două sisteme de diacizi tetracarbonici se intercalează un alt ferment galben, „diaforaza", care prin valoarea potenţialului ei stabileşte un lanţ continuu între cele două sisteme.

Scanned with OKEN Scanner

Fermentul galben redus de dihidrocodehidrază e oxidat de sistemul acid malic ⇄ acid oxaloacetic, care la rândul lui e oxidat de sistemul acid fumaric ⇄ acid succinic, tot prin intermediul unui ferment galben. Sistemul acid fumaric ⇄ acid succinic, în prezența succinodehidrazei, reduce seria citocromilor printr'un transport de electroni în ordinea citocrom *b* → citocom *c* → citocrom *a*, prin treceri reversibile ale fierului din moleculă de ion feros Fe^{++} în ion feric Fe^{+++}.

Citocromul redus transmite electronul său *citocromoxidazei* și aceasta îl transmite oxigenului molecular, care prin fixare de electroni se transformă în oxigen ionic activ. Schema acestui lanț de reacții e următoarea :



In prima fază a acestui lanț de reacții intermediare se face transportul hidrogenului molecular de pe un sistem oxidoreductor pe altul. Ajuns la acidul succinic, prin intervenția catalitică a succinodehidrazei, hidrogenul nu mai e transmis mai departe citocromilor sub formă de atom de hidrogen, ci aici se face separarea atomului în proton H^+ și electron ; protonul H^+ trece în soluție constituind ionul H^+, iar electronul își continuă drumul mai departe pe calea citocromilor și citocromoxidazei spre oxigenul molecular.

Electronul desfăcut de pe atomul de H se fixează pe citocromul *b* oxidat, reducându-l, citocromul *b* redus transportă electronul citocromului *c* oxidat, și îl reduce, citocromul *c* redus transportă electronul pe citocromul *a* oxidat și îl reduce, citocromul *a* redus transportă electronul său pe citocromoxidază oxidată și o reduce.

Citocromoxidaza redusă e autooxidabilă și transportă electronul său direct pe oxigenul molecular care, fixând electronii, se transformă în ion de oxigen activ. El trece în soluție, unde întâlnește ionul H^+ activ, cu care, sub această formă activată, se poate uni direct în condițiile fiziologice ale vieții celulare.

Este probabil că seria produselor intermediare enumerate aici nu este complectă și că cercetări ulterioare vor arăta intervenția și a altor sisteme și a altor căi de degradare oxidativă. Aceste scheme ale degradării oxidative a metabolitelor indică însă două fapte importante : primul, că o reacție simplă „*in vitro*", pentru a fi realizată în organism în condiții

compatibile cu viaţa, trebue să treacă printr'o serie de reacţii intermediare, care să necesite fiecare în parte niveluri de energie de activare mai mici decât cel cerut de reacţia directă; şi al doilea fapt, că această eşalonare în reacţii intermediare este necesară, deoarece energia degajată în reacţia directă e infinit prea mare pentru a fi utilizată dintrodată de celulă pentru nevoile sale energetice. Această energie eşalonată însă în fracţiuni mici permite utilizarea ei imediat în momentul în care celula are nevoie de ea pentru realizarea travaliului de sinteză, osmotic, muscular, etc. Celula are nevoie de cantităţi mici de energie, dar aduse continuu şi în momentul necesar. De exemplu, când hidrogenul substratului e fixat de codehidrază se eliberează energie, dar concomitent are loc o fixare de grupare de acid o-fosforic, o esterificare, care necesită aport de energie din afară şi care, deci, poate fi dată de prima reacţie.

FERMENŢII DE APĂRARE AI LUI ABDERHALDEN

Sunt fermenţi care apar în circulaţia sanguină după introducerea în organism de substanţe structural străine de acest organism. Aceşti fermenţi tind să distrugă substanţele introduse.

De exemplu, injectând la un iepure albumină de ou apar în sânge fermenţi care atacă peptona preparată din albumina de ou; sau, injectând zaharoză în sânge, apare aici invertina (zaharaza). Abderhalden a dat acestor fermenţi numele de fermenţi de apărare (Abwehrfermente). Sunt caracterizaţi printr'o mare specificitate faţă de substanţa care a provocat apariţia lor. Apar în organism extrem de repede; uneori, la 24 de ore după aportul parenteral al substanţei respective, se găsesc în sânge şi uneori în urină.

După Abderhalden, aceşti fermenţi de apărare apar şi atunci când în organism se petrec anumite fenomene fiziologice (sarcină) sau patologice (cancer) întovărăşite de pătrunderea în sânge a unor substanţe proteinice străine. In cazul sarcinii de exemplu, din placentă pătrund în circulaţia sanguină proteine străine; acestea produc fermenţi specifici care atacă proteina şi peptona placentară. Ei apar în sânge la 8 zile după fecundare. Apariţia fermenţilor de apărare poate fi în felul acesta o indicaţie a existenţei în organism a acestor procese fiziologice sau patologice. Bazat pe acest principiu, Abderhalden dă o tehnică de diagnostic precoce al sarcinii. Aceeaşi metodă o utilizează şi ca metodă de diagnostic precoce al cancerului.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL III

BIOCHIMIA SUCURILOR DIGESTIVE

SALIVA

Saliva este secretată de celulele a trei glande: submaxilara, sublinguala şi parotida, precum şi de aşa numitele glande bucale. Secreţiile acestor diverse glande sunt diferite: secreţia parotidei are un conţinut mic în componente organice, este apoasă şi are putere digestivă mare. Secreţia glandei submaxilare poate fi seroasă sau vîscoasă (mucoidă), caracterul său depinzând de stimulul secretor. Secreţia sublinguală este în genere mucoidă. Cantitatea de salivă secretată în 24 de ore este de 1 000—1 200 cc.

Secreţia salivară este sub controlul sistemului nervos; nu există indicaţii asupra existenţei unui mecanism hormonal. Nervii secretori ai glandelor salivare provin din sistemul specific bulbar şi din sistemul tonico-bulbar al sistemului nervos autonom. Secreţia salivei este rezultatul unei stimulări reflexe a nervilor secretori prin intermediul centrului din medulla oblongata. In timpul activităţii glandei are loc o creştere a consumului de oxigen, indicând că producerea salivei este un proces secretor şi nu un simplu proces de ultrafiltrare din curentul sanguin.

Secreţia salivei în condiţiile naturale poate fi provocată de stimularea nervilor bucali datorită alimentelor sau altor substanţe, sau de stimularea altor simţuri decât cel gustativ. In primul caz *reflexul este necondiţionat*, în al doilea caz, *reflexul este condiţionat*.

Experienţele fundamentale ale lui Pavlov au arătat că proprietăţile fizice şi chimice ale salivei, precum şi cantitatea de salivă secretată, sunt condiţionate de substanţa care a declanşat reflexul. Substanţele acide produc o salivă abundentă, bogată în proteine, care exercită o acţiune de tamponare cu tendinţa de a neutraliza aciditatea. Dacă alimentul este uscat, secreţia este cea caracteristică glandelor parotide, adică este apoasă şi abundentă.

In experienţe pe animal s'a reuşit să se producă artificial secreţii de salivă cu componenţe variate.

Glandele salivare au o inervaţie dublă; excitarea artificială a nervilor parasimpatici produce secreţia unei salive fluide, în cantitate mare; dimpotrivă excitaţia nervilor simpatici produce o salivă puţin abundentă, bogată în substanţe solide.

Scanned with OKEN Scanner

In cazul reflexului secretor condiţionat, deci în absenţa unei alimentaţii pe gură, stimulul care iniţiază reflexul nu mai este aplicat nervilor din gură, ci este transmis prin unul sau altul din organele senzoriale (văz, auz, miros, piele) de către sistemul nervos central. In crearea acestui reflex intervin repetarea şi câştigarea experienţei.

Compoziţia salivei

Compoziţia salivei depinde de factori multipli; stimul, alimentaţie, vârstă, timpul în cursul unei zile. Reacţia salivei este în genere slab acidă (pH = 6,35 —6,85 în 96% din cazuri), dar poate fi şi mai acidă şi mai alcalină (pH=6,07—7,9) (pentru determinarea pH-ului se evită pierderile de CO_2). pH-ul este în funcţie de raportul acid carbonic/bicarbonat. Se pare că concentraţia ionilor de hidrogen din salivă este în funcţie de CO_2 sanguin. Retenţia de CO_2 în sânge creşte excreţia de CO_2 în salivă. Ingestia de $NaHCO_3$ măreşte şi aciditatea printr'o creştere a tensiunii CO_2 în sânge. Ingestia de $NaHCO_3$ măreşte alcalinitatea urinii şi scade pe aceea a salivei.

Cantitatea de salivă excretată la adult în 24 de ore variază între 1 000—1 500 cc, în funcţie de stimul, de caracterul alimentaţiei, etc. In absenţa unui stimul, este de 0,1—0,9 cc pe minut (în medie 0,25 cc pe minut). Greutatea specifică a salivei este între 1,002—1,012. Punct de congelare $\Delta = 0{,}2° - 0{,}4°$. Are aproximativ 0,7% substanţe solide; din acestea, 0,5% sunt substanţe organice, 0,2% substanţe minerale. Din substanţele organice, aproximativ 0,4% sunt proteine. Componentele salivei sunt următoarele:

Săruri: ClK, ClNa, CO_3HNa, PO_4H_2Na, PO_4HNa_2, CO_3Ca, $(PO_4)_2Ca_3$, SCNK. Gaze: CO_2, O_2 şi N.

Substanţele organice care intră în compoziţia salivei sunt: albumină, globuline, uree, acid uric, creatină, aminoacizi, mucină, colesterol, enzime în cantitate mică, lipaze, proteinaze, lizozim, amilază. Glucoza este absentă, chiar în cazuri de diabet. Conţine vitamină C, iar printre enzime, cea mai importantă este amilaza.

Dăm un tabel al valorilor diverselor componente în saliva normală, recoltată în condiţii anumite (postabsorbtive), deoarece compoziţia variază extrem de mult cu aceste condiţii (v. tabelul 15).

Tabelul 15

Constituentul	*Valorile*
pH	6,35 — 6,85
Aciditatea (exprimată în HCl, 0,02 N)	90,0 — 190,0 cc % cc
Azot amoniacal	2,0 mg % cc
Calciu total (sub formă de Ca^{++})	4,0 — 8 mg % cc
Fosfor anorganic (sub formă de PO_4^{---}	10,0 — 25 mg % cc
Sodiu (sub formă de Na^{+})	20,0 — 30,0 mg % cc
Cloruri (sub formă de Cl^{-})	30,0 — 60,0 mg % cc
Potasiu (sub formă de K^{+})	50,0 — 100,0 mg % cc
Carbonaţi (sub formă de Co_3H^{-})	20,0 — 45 mg % cc
Magneziu (sub formă de Mg^{++})	1,0 mg % cc
Proteine	200,0 — 400,0 mg % cc
Colesterol	2,5 — 9,0 mg % cc
Fosfor lipidic	0,05 — 0,20 mg % cc
Sulfocianat	urme

Rolul bicarbonaţilor şi fosfaţilor ar fi de tamponare, deoarece pH-ul salivei se menţine în limite destul de fixe. Clorurile sunt necesare activării amilazei.

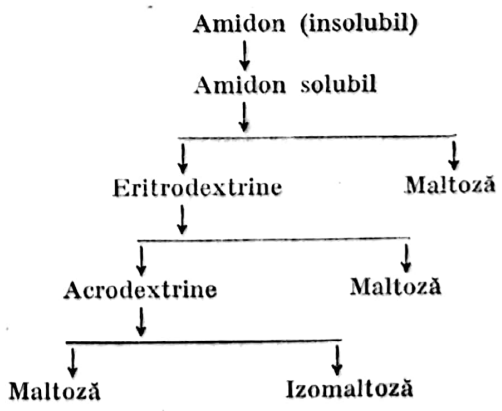
Aşa numita piatră formată pe dinţi (tartrul) este datorită unei depozitări de fosfat de calciu şi carbonat de calciu combinat şi cu urme de substanţe organice. Acestea se pot depune şi sub formă de concreţiuni, constituind calculii salivari în canalele salivare. Un pH acid şi un suc salivar bogat în mucină favorizează depozitarea tartrului dentar şi formarea de calculi salivari.

Sulfocianura de potasiu (SCNK) se găseşte totdeauna în salivă (câteva zeci de mg în 24 de ore). Este un produs de excreţie (probabil format din radicalul CN, rezultat al metabolismului proteinic sau din ingestia fructelor), iar excreţia ei ar reprezenta un mecanism de desintoxicare. In saliva fumătorilor se găseşte în cantitate mai mare; în pelagră, cantitatea este redusă.

Mucina este o componentă proteinică caracteristică salivei şi care îi conferă vîscozitatea. In constituţia ei intră acidul mucoitinsulfuric; poate fi precipitată din salivă cu acizi diluaţi, alcool, soluţie saturată de sulfat de amoniu. Alte produse care apar în salivă sunt în cantitate mai mică; aşa sunt albuminele şi globulinele.

Ureea ar exista în saliva proaspăt excretată în concentraţie de 75—90% din ureea sanguină, dar este repede transformată în gură sub acţiunea florei bacteriene. Deasemenea s'a găsit în salivă alcool în concentraţia din sânge, fapt care serveşte investigaţiilor în medicina legală.

Enzimele salivare. Saliva conţine o serie de *enzime în cantitate mică*: lipaze, proteinaze, peptidaze, al căror rol este, probabil, neînsemnat, Conţine lizozim, care se ştie că are acţiune de liză asupra microorganismelor, prin acţiunea sa mucolitică exercitată asupra polizaharidelor capsulare bacteriene. Enzima cea mai importantă, cantitativ şi functional, din salivă, este amilaza salivară (ptialina), care degradează polizaharidele alimentare până la stadiul de maltoză prin stadiul intermediar de dextrine (care se pot pune în evidenţă prin reacţia caracteristică cu iod). Amilaza se găseşte numai în saliva umană, la maimuţă şi porc. Rozătoarele, ierbivorele, nu au amilază salivară. Amilaza din salivă este în special α-amilaza; este activă în mediu neutru, slab alcalin şi slab acid (optimul la pH = 6,6). Prin creşterea aciditătii acţiunea amilazei salivare este inhibată (sub pH = 4,0). Inlăturarea clorurilor din salivă prin dializă inactivează amilaza, iar adăugarea de cloruri restabileşte activitatea enzimei, clorul funcţionând astfel ca o adevărată coenzimă. Bromul şi iodul au deasemenea acţiune de stimulare, dar mai slabă. Este extrem de sensibilă la acţiunea acizilor. Aminoacizii şi în special asparagina stimulează acţiunea amilazei. Metalele grele o inhibă. Acţiunea amilazică a salivei începe scurt timp după contactul cu amidonul şi anume prin acea solubilizare căreia îi urmează stadiile ulterioare cu formare de: eritrodextrină, acrodextrină, maltoză, conform schemei.



Amilaza salivară nu acționează asupra celulozei, deaceea se recomandă în'ăturarea învelișului celulozic al grăunțelor de amidon, prin fierbere, fapt care produce și o hidratare a amidonului, ceeace ușurează acțiunea amilazei. In salivă se găsesc, în suspensie, celule epiteliale provenite din descuamarea mucoasei bucale, leucocite, elemente bacteriene.

Funcțiile salivei

Funcțiile salivei sunt multiple:

1. Funcții digestive datorite prezenței amilazei. Are acțiune asupra cazeinei din lapte, care este precipitată în flocoane fine, ce pot fi ușor atacate ulterior de enzimele digestive.

2. Prin caracterul său mucoid, vîscos, transformă alimentele într'o massă plastică vîscoasă, favorizând deglutiția și masticația alimentelor. Are astfel un rol mecanic important, conferit în special de prezența mucinei.

3. Are acțiune de solubilizare a substanțelor solide.

4. Are acțiune de îndepărtare din gură a urmelor alimentare și în genere a componentelor străine ce ar putea constitui un mediu de cultură favorabil desvoltării bacteriilor.

5. Are rolul de a menține umiditatea mucoaselor (din gură, buze, etc.).

6. Are rol excretor. In intoxicațiile cu metale (Hg, Pb, Sb), medicamente, are loc o eliminare a acestora prin salivă. In nefrite crește cantitatea de uree eliminată în salivă, mergând paralel cu cantitatea de uree din sânge.

Virusul poliomielitic este eliminat în salivă.

7. Saliva are rol în reglarea apei în organism. Când sunt eliminări masive de apă în organism se produce o deshidratare a mucoaselor și, drept consecință, o subpresiune a secreției salivare. Uscarea mucoaselor orale și stimularea nervilor aferenți din gură produc senzația de sete, care constitue un mecanism de apărare în cazul unei pierderi masive de lichide în organism.

8. Saliva are rol antiseptic, prin prezența unor factori bacteriolitici (de exemplu lizozimul), a mucinei.

Corelația dintre cariile dentare și compoziția salivei este o problemă încă discutată. Se crede că acidificarea salivei este un factor care stimulează formarea cariilor dentare.

SUCUL GASTRIC

Cunoștințele asupra digestiei gastrice au fost extinse în mod deosebit de către Pavlov cu ajutorul micului stomac — realizat la câine, separat de stomacul principal și deschis la exterior, astfel încât se putea studia secreția fără a interfera cu procesele din stomacul propriu zis. In felul acesta a fost posibil studiul acțiunii diverșilor factori ai secreției gastrice și au fost obținute date fiziologice și aplicații clinice extrem de importante.

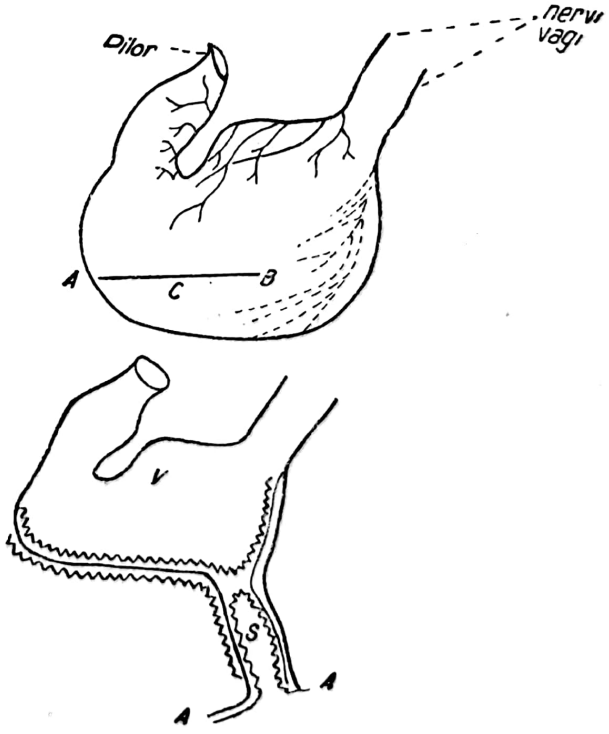
Secreția sucului gastric

Sucul gastric este secretat de glandele mucoasei stomacale. Secreția lui se desfășoară în mai multe faze: faza psihică, faza gastrică și faza intestinală.

Scanned with OKEN Scanner

In *faza psihică*, simpla prezentare a alimentelor produce o secreție a sucului gastric, indusă de simțul vederii, mirosului sau numai de gândul la mâncare.

Faza psihică a secreției sucului gastric a fost demonstrată prima oară de Pavlov pe câine. Pentru acest studiu și în genere pentru toate problemele de fiziologie gastrică, Pavlov a realizat următoarea operație, devenită clasică. O incizie longitudinală este făcută în stomac, în regiunea marei curburi (fig. 97). Aceasta interesează atât peretele anterior, cât și cel posterior al organului, începe aproape de regiunea pilorică și se termină aproximativ în mijlocul regiunii fundice. Se formează o pungă care rămâne lipită de regiunea fundică prin baza ei. Marginile ei cât și cele ale stomacului principal sunt suturate separat. In felul acesta se creează un mic tub căptușit cu mucoase gastrice normale, cu un capăt liber deschis și fără legătură cu stomacul principal. Este așa numitul „micul stomac". Prin fistula stabilită în felul acesta se poate colecta suc gastric fără aliment și în același timp digestia continuă normal în restul stomacului. Micul stomac reproduce fidel ceeace se produce în stomacul principal în diverse condiții experimentale. Pentru studiul fazei psihice a secreției gastrice era esențial ca alimentele să nu aibă acces în stomac. Pentru aceasta, Pavlov, realizează o fistulă esofagiană : animalul înghite, dar alimentele sunt eliminate prin deschiderea esofagului. Această „alimentație fictivă" produce totuși o abundentă secreție gastrică, urmată de o perioadă scurtă de latență. In unele experiențe se secretă aproximativ 700 cc suc gastric pur în stomac, dacă alimentația fictivă se continuă 5—6 ore. Chiar după 5 minute de alimentație fictivă, secreția persistă 2—3 ore și produce 200—300 cc de suc bogat în pepsină. Izolarea de nervii vagi inhibă complect această reacție, ceeace arată că fenomenul este datorit unui reflex prin intermediul pneumogastricilor. Proprietățile chimice și fizice ale alimentelor nu sunt importante, dar preferința animalelor pentru aceste alimente are importanță : de exemplu, carnea produce o secreție abundentă și bogată în ferment, pâinea mai puțin. Reacția este pronunțată când animalul este flămând. Secreția nu are loc când se introduc în gură substanțe nedigestibile sau novice (acid, piper, etc.), ele pot chiar inhiba secreția, care este deja în progres.



A—A = peretele abdominal

Fig. 97. Micul stomac Pavlov

Faptul că simpla vedere a unui aliment, apetitul sau mirosul produc secreție, denotă fixarea unui „reflex condiționat" (ca și pentru secreția salivară). Rolul secreției psihice

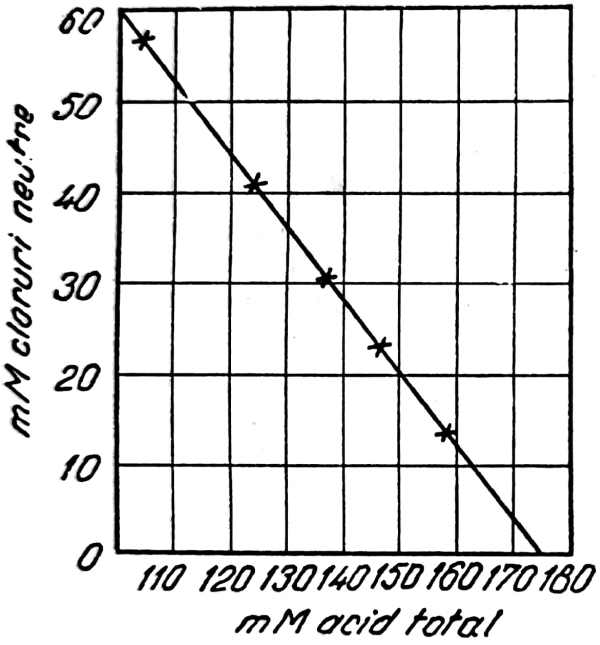
este deosebit de important. Dacă, de exemplu, se introduce în stomac printr'o fistulă un aliment (carne sau pâine), când animalul este în stare de somn, digestia este mult mai lentă, decât atunci când animalul a văzut sau mirosit alimentul înainte de introducerea lui în stomac.

Elementul timp este foarte important (Babkin). Astfel, un animal, deprins a fi hrănit la anumite ore, secretă cantităţi mari de suc gastric la acele ore, chiar când nu este alimentat. Toate constatările făcute de Pavlov în experienţele pe câine au fost confirmate la om.

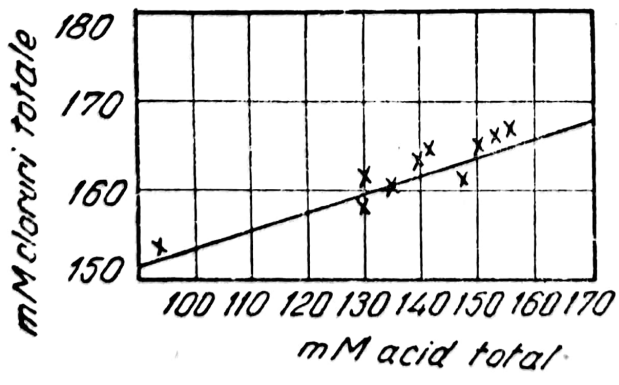
Efectul practic asupra secreţiei gastrice a fost demonstrat la indivizii în stare de hipnoză. O sugestie făcută acestor indivizi în legătură cu natura savuroasă a unui aliment, produce secreţie de suc gastric.

In *faza gastrică*, secreţia se produce în momentul în care alimentul ajunge în stomac, datorită fie unei acţiuni chimice a substanţelor alimentare introduse şi deja degradate — fie unei acţiuni mecanice în urma dilatării stomacului de către alimente.

Din mucoasa gastrică s'a izolat o substanţă căreia i s'a dat numele de gastrină şi care are proprietatea de a stimula intens secreţia gastrică. Histamina are deasemenea această proprietate şi nu se ştie dacă nu ar fi identitate între gastrină şi histamină. Histamina este folosită în clinică în examenul secreţiei gastrice.



A. Clorurile neutre în funcţie de aciditate



B. Clorurile totale în funcţie de aciditate

Fig. 98. Variaţia clorurilor în funcţie de aciditate.

Faza intestinală a secreţiei gastrice este datorită produselor de degradare a alimentelor ajunse în intestin — nu se cunoaşte prin ce mecanism. Apa are o acţiune stimulantă asupra secreţiei gastrice.

La secreţia sucului gastric participă cel puţin trei tipuri celulare diferite din mucoasa gastrică: 1) Celulele parietale, 2) celulele fundamentale şi 3) celulele mucoide.

Celulele parietale secretă acidul clorhidric din sucul gastric, celulele fundamentale, pepsina şi, probabil şi celelalte enzime; celulele mucoide secretă mucina, fiecare grup de celule fiind dirijat în secreţie de stimulenţi nervoşi sau chimici diferiţi.

Secreţia parietală ar fi o soluţie izotonică, conţinând 160—170 miliechivalenţi HCl la 1000 ml şi KCl aproximativ

7 miliechivalenţi la 1000 ml. Aciditatea secreţiei parietale corespunde astfel unei soluţii 0,16 N de HCl sau 0,5—0,6% HCl.

S'a constatat că, pe măsură ce acidul clorhidric din sucul gastric creşte, ceilalţi constituenţi scad. Valoarea acidităţii secreţiei parietale este, după Pavlov, o constantă independentă de ritmul secreţiei, dar este micşorată imediat ce secreţia parietală vine în contact cu secreţia uşor alcalină a celulelor fundamentale şi mucoide care conţine o cantitate mai mare de clorură de sodiu, astfel, că, raportat la clorurile totale, aciditatea este mai scăzută (fig. 98). Aşa se explică de ce sucul gastric, recoltat în mod obişnuit, are o aciditate actuală mai mică (0,05—0,1 N respectiv 0,18—0,3% Cl H).

Aciditatea sucului gastric

Se exprimă în general prin numărul de mililitri NaOH 0,1 necesari pentru a neutraliza 100 ml. suc gastric (aceasta corespunde numeric concentraţiei de acid în miliechivalenţi la 1000 ml).

Acidul clorhidric din sucul gastric constitue un mediu favorabil activităţii pepsinei, enzima proteolitică cea mai importantă din această secreţie — şi, în acelaş timp, acţionează ca un antiseptic sau germicid prevenind procesele de putrefacţie în stomac. In cazuri de hipoaciditate se constată, în adevăr, formarea unor cantităţi importante de acid lactic şi butiric, ca rezultat al proceselor fermentative bacteriene.

Mecanismul de formare a acidului clorhidric din sucul gastric

Sursa cea mai importantă de clor din sucul gastric este clorura de sodiu din sânge. Faptele experimentale care justifică această interpretare sunt următoarele:

1. animalele hrănite cu alimente lipsite de NaCl secretă un suc gastric lipsit de HCl;
2. animalele hrănite cu bromură de sodiu sau iodură de sodiu, secretă un suc gastric ce conţine acid bromhidric sau acid iodhidric;
3. pierderi masive de suc gastric duc la o scădere a clorurilor sanguine.

Problema care se pune este aceea a mecanismului de transformare a NaCl sanguine în HCl şi a locului unde are loc această transformare. Această problemă a fost studiată cu ajutorul coloranţilor vitali care îşi schimbă culoarea în raport cu pH-ul mediului. Cu ajutorul acestor coloranţi şi folosind micul stomac, s'a demonstrat că în timpul secreţiei, celulele mucoasei au un pH în jurul neutralităţii. Se admite că sediul formării HCl ar fi suprafaţa citoplasmei sau însuşi peretele intracelular.

Asupra mecanismului de formare a HCl pe seama ClNa sanguine, au fost formulate mai multe teorii. O teorie (Maly) admite că ar avea loc următoarele reacţii:

$$NaH_2PO_4 + ClNa \rightarrow Na_2HPO_4 + ClH$$

$$Na_2HPO_4 + H_2CO_3 \rightarrow NaH_2PO_4 + NaHCO_3$$

HCl format este repede eliminat în tubulii glandelor parietale, bicarbonatul trece în sânge, iar NaH_2PO_4 se reformează.

Metode microchimice ar susţine această interpretare prin identificarea unei cantităţi mari de fosfaţi în celulele parietale.

Scanned with OKEN Scanner

S'a constatat deasemenea că în timpul secreției gastrice, odată cu descreșterea clorurilor în sângele arterial, cresc bicarbonații din sângele venos. Există o corelație, în orice caz, între secreția de acid din sucul gastric și conținutul în CO_2 din sânge. Faptul că celulele parietale conțin o cantitate mare de carbonic-anhidrază a dus la următoarea interpretare a mecanismului de formare a sucului gastric în aceste celule.

Carbonic-anhidraza, se știe, catalizează reacția de hidratare a CO_2 care, în soluție, se disociază cu producere de ion H^+ și ion bicarbonic HCO_3 — conform reacției :

$$CO_2 + H_2O \rightleftarrows H_2CO_3 \rightleftarrows H^+ + HCO_3^-$$

Ionul H^+ astfel format trece în celulele parietale, iar ionul bicarbonic trece în sânge unde înlocuește un număr echivalent de ioni Cl^- ; acești ioni Cl^- difuzează în celulele parietale și, unindu-se cu ionul H^+, formează ClH care este excretat în sucul gastric. Deci, ionul H^+ provine din acidul carbonic, iar ionul Cl^- din sânge. Inlocuirea clorurilor din sânge prin bicarbonați duce la o alcalinizare și, într'adevăr, s'a constatat că pH-ul sângelui care părăsește stomacul în timpul digestiei, este mai alcalin decât acela al sângelui care intră în stomac.

Teoria intervenției carbonic-anhidrazei, deși explică producerea acidului de către celulele parietale, este combătută pe baza faptului, experimental constatat, că inhibitorii carbonic-anhidrazei ca de exemplu sulfanilamida — nu inhibă în același timp și secreția gastrică.

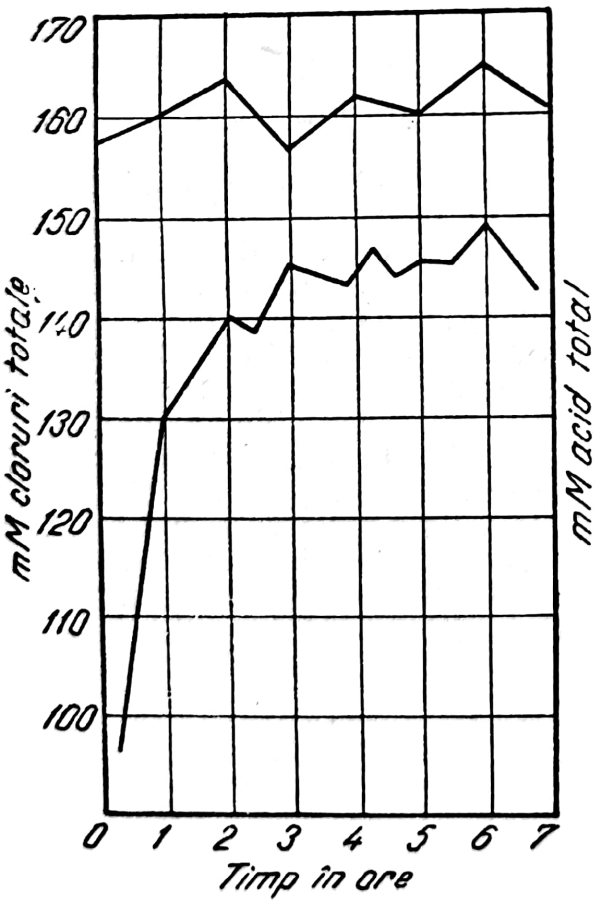


Fig. 99. Clorurile totale în funcție de timp

O altă teorie, fizico-chimică, este bazată pe hidroliza ClNa la nivelul membranei celulare și separarea produselor de hidroliză printr'un mecanism de permeabilitate selectivă a acestei membrane (Hollander)

$$NaCl + H_2O \rightarrow HCl + NaOH$$

Ionul Cl^- și H_2O pot străbate membrana celulară în direcția dinspre citoplasmă, dar nu și invers. S'ar putea ca în acest mecanism să intervină și un echilibru de tip Donan.

Enzimele din sucul gastric

Pepsina. Pepsina este enzima cea mai caracteristică a sucului gastric. Este secretată de celulele principale ale glandelor fundice. Se găsește în citoplasma acestor celule sub forma inactivă de zimogen — pepsinogenul — și este transformată sub acțiunea HCl în enzima activă. PH-ul optim de acțiune variază cu proteina asupra căreia acționează : pentru

cazeină pH = 1,8, pentru gelatină pH = 2,2. Este o endopeptidază. Prima acţiune a sucului gastric este acea de transformare a proteinei în proteina denaturată, metaproteina solubilă în mediul acid din stomac. Acţiunea pepsinei asupra proteinelor se exercită până la stadiul de peptone cu molecula destul de mică, scindarea făcându-se la legăturile în care participă aminoacizii tirozina sau fenilalanina, iar produsele finale de hidroliză depinzând, astfel, de poziţia acestor aminoacizi în molecule proteinice. Pepsina acţionează asupra tuturor proteinelor native cu excepţia keratinei (din cauza catenelor polipeptice strâns unite şi a protaminei care nu conţine tirozină şi fenilalanină), iar intensitatea ei de acţiune variază cu natura proteinei, cu densitatea lichidului de digerat. Astfel, cazeina şi fibrina sunt mai uşor atacate decât proteinele vegetale edestina, glutina. (Detalii asupra acestei enzime sunt date la capitolul enzimelor).

Rennina este enzima de coagulare a laptelui. Se crede că este produsă tot de către celulele fundamentale ale glandelor fundice. Este secretată sub formă de precursor inactiv, prorennina şi e activată de HCl.

La adulţi există în concentraţie mică sau este chiar absentă; se găseşte în cantitate mare în mucoasa gastrică a sugacilor la care pH-ul sucului gastric corespunde pH-ului optim, 6,0—6,5, al renninei.

Rennina gastrică, acţionând asupra caseinei solubile din lapte, o transformă într'o proteoză şi în paracaseină, aceasta din urmă, în combinaţie cu calciul, formează compusul insolubil calciuparacaseină. La unele animale, coagularea laptelui o realizează rennina (chiar la pH-uri mai alcaline).

Lipaza gastrică este enzima care scindează hidrolitic grăsimile, acţionează în mediu acid, dar cu activitate slabă spre deosebire de acea pancreatică şi are mult mai mică importanţă în degradarea grăsimilor decât aceasta din urmă. Acţiunea ei este mult intensificată în condiţiile în care aciditatea gastrică este mai scăzută (fiziologic sau patologic).

Compoziţia sucului gastric

Sucul gastric este un lichid clar sau uşor opalescent, incolor, fără miros, având o greutate specifică medie 1,007. Conţine aproximativ 0,5% substanţă solidă, formată în special din ClNa, ClK, fosfaţi minerali $(PO_4)_3$ Ca_2, mucină, acizi organici (acid lactic, acid butiric), enzime.

Are o reacţie puternic acidă (pH-ul în jurul valorii 1,0 deci corespunzând, aproximativ, unei soluţii N/10 de HCl, datorită conţinutului său în acid clorhidric liber.

Compoziţia variază mult cu alimentaţia (de exemplu alimentele bogate în proteine provoacă o mărire a acidităţii), cu diverşi factori, ca: specia animală, condiţiile fiziologice în care a fost recoltat, etc. Un om cu alimentaţie mixtă secretă în condiţii fiziologice normale 1 500 cmc suc gastric în 24 ore. Dăm un tabel al compoziţiei sucului gastric obţinut pe nemâncate cu ajutorul unei fistule (tabelul 16).

Tabelul 16

	Rezultate în gr %		*Rezultate în gr %*
Greutate specifică	1.006—1.009	Substanţe organice solide	0,42 —0,46
Δ crioscopic	0,60°—0,64°	Substanţe minerale solide	0,13 —0,14
pH	0,92 —0,58	Azot total	0,060
Aciditate totală (HCl)	0,45 —0,60	Azot amoniacal	0,002—0,003
Aciditate liberă (HCl)	0,40 —0,50	Azot aminoacid	0,003—0,009
Substanţe solide	0,55 —0,60	Cloruri (*NaCl*+KCl, NH_4 Cl) exprimat în Cl	0,50—0,58

Scanned with OKEN Scanner

Mucina gastrică este un glicoproteid, având rol de protecţie a mucoasei stomacale prin capacitatea ei de a se combina cu acizii, prin acţiunea antiseptică, prin acţiunea de apărare contra efectelor mecanice. Se foloseşte în tratamentul ulcerelor gastrice şi duodenale căci o cauză a acestora ar fi turburarea secreţiei de mucină de către celulele care căptuşesc suprafaţa internă a stomacului.

Analiza sucului gastric este foarte importantă pentru studiul funcţiei digestive. Se determină în mod curent aciditatea totală, aciditatea liberă, pH-ul, activitatea peptică, prezenţa acidului lactic, prezenţa sângelui ocult. Sucul gastric se analizează fie după administrarea unui prânz de probă (prânzul Ewald) ca stimulent al secreţiei gastrice (unii autori susţin că apa simplă stimulează secreţia gastrică ca şi prânzul Ewald iar utilizarea ei ar avea avantajul că în probele recoltate nu mai există şi urme alimentare) — fie după administrarea, prin injecţii subcutanate, de clorhidrat de histamină (doze de 0,5—1 mgr), care stimulează secreţia gastrică aparentă şi reală.

Aciditatea totală reprezintă suma concentraţiei de HCl liber şi HCl combinat cu proteinele şi este determinată cu NaOH 0,1 N în prezenţa unui indicator (fenol-ftaleina) care reacţionează cu toţi acizii prezenţi, liberi sau combinaţi (acizi minerali, acizi organici). Se exprimă în cc NaOH 0,1 N necesari a neutraliza 100 cc suc gastric.

Valorile acidităţii normale, cuprinse între 1,8—2,3 gr HCl %, după prânzul Ewald, sunt crescute (3,5—5 gr HCl %) în hiperclorhidrie, când se găseşte, o cantitate mare de HCl liber (în ulcer stomacal). Aciditate slabă, însoţită de absenţa HCl liber — hipoclorhidrie, sau anaclorhidrie — se întâlneşte în cancerul stomacului.

Hipoclorhidria sau aclorhidria întovărăşesc totdeauna anemia hipocromă şi anemia pernicioasă.

Acidul clorhidric din sucul gastric este un factor important în eliberarea fierului din alimente şi transformarea lui în stare feroasă — stadiul preliminar necesar pentru absorbţie.

In sucul gastric s'a constatat prezenţa unui principiu activ eficace în anemia pernicioasă, un principiu anti-anemic, aşa numitul factor „intrinsec", o substanţă analoagă enzimelor. Acest factor intrinsec se formează, la om, în regiunea fundică a stomacului.

In producerea principiului antianemic sunt implicaţi doi factori: o substanţă analoagă enzimelor care se găseşte în sucul gastric normal şi un factor alimentar. Primul factor este aşa numitul „factor intrinsec", al 2-lea factor, aşa numitul „factor extrinsec". Principiul antianemic ar rezulta din acţiunea factorului „intrinsec" (gastric) asupra factorului „extrinsec" din alimentaţie. Principiul antianemic este depozitat în ficat şi, poate, şi în alte organe de unde este folosit ulterior pentru menţinerea normală a activităţii ţesutului eritropoetic.

Anemia pernicioasă are loc atunci când lipseşte factorul intrinsec din sucul gastric.

Principiul antianemic acţionează asupra măduvei osoase restabilind procesul normal de formare a sângelui.

Aciditatea liberă (HCl liber) se determină tot cu NaOH 0,1 N în prezenţa unui indicator astfel ales, încât punctul final să corespundă numai acidului puternic ionizat din sistem, respectiv HCl (acizii ceilalţi fiind slab ionizaţi, nu contribue la valorile acidităţii libere).

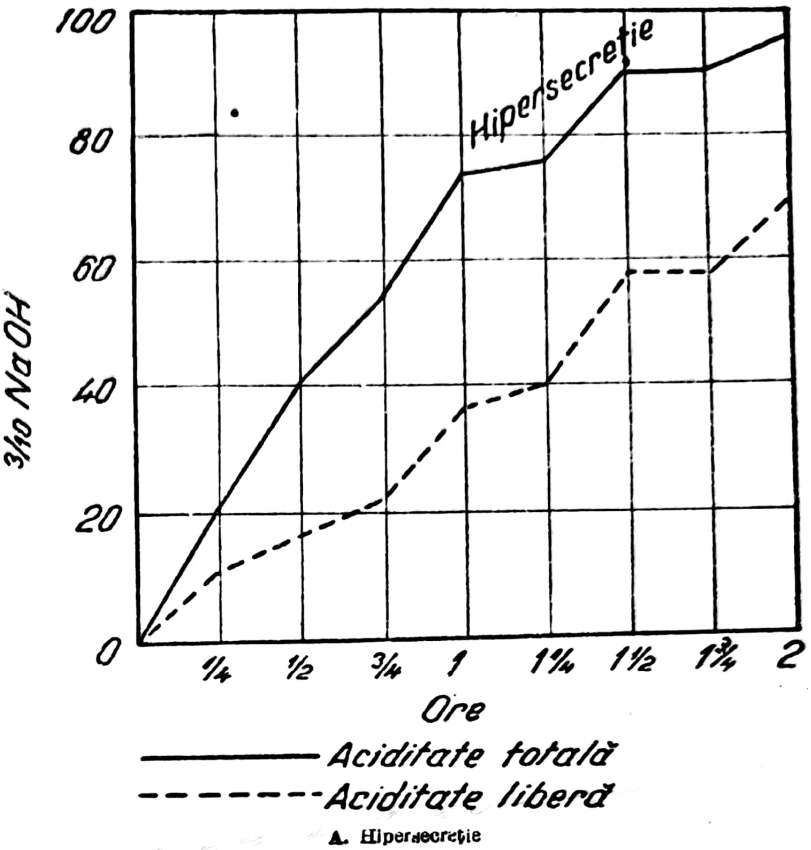
Scanned with OKEN Scanner

Determinarea aceasta este importantă, deoarece condiţionează pH-ul sucului gastric. Se poate astfel folosi ca o indicaţie, în locul determinării HCl liber, determinarea pH-ului sucului gastric (fie colorimetric, fie electrometric). Indicatorul cel mai frecvent folosit în determinarea acidităţii libere este reactivul Töpfer (soluţie alcoolică 0,5% de dimetilaminoazobenzen).

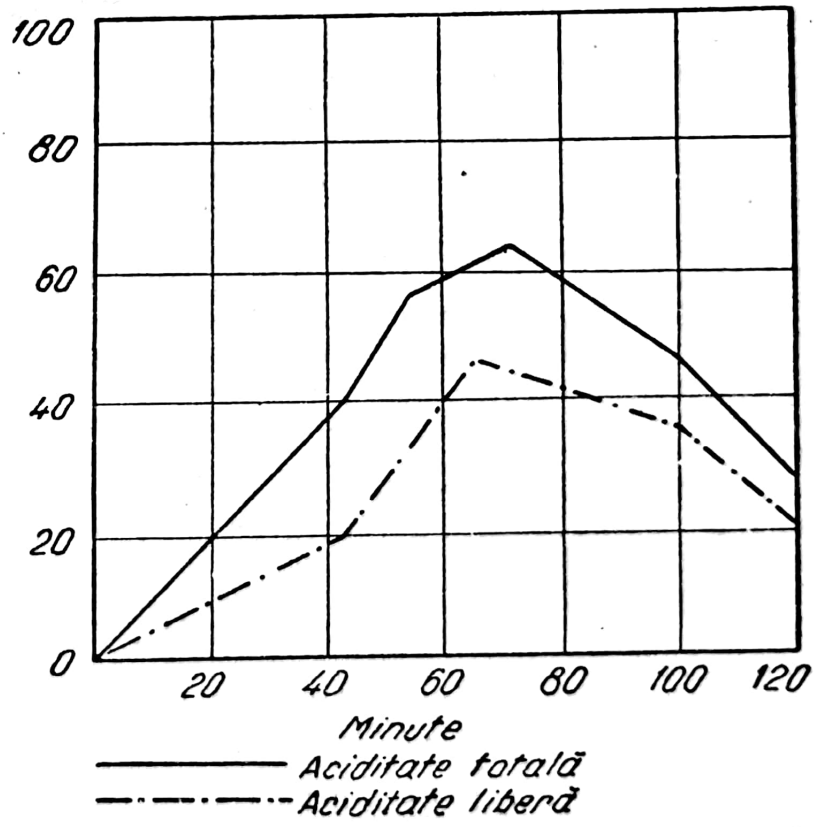
Diferenţa dintre aciditatea totală şi aciditatea liberă reprezintă HCl legat de proteinele din sistem şi poate arăta capacitatea de tamponare a sucului gastric.

Punerea în evidenţă a acizilor organici, în special a acidului lactic în sucul gastric este importantă deoarece, în cazurile unei hipoaciditaţi, (de exemplu în cazuri de stenoză pilorică mai ales de origină neoplasică), au loc procese de fermentaţie a glucidelor introduse în stomac (fig. 100).

Acidul lactic se pune în evidenţă cu ajutorul sărurilor ferice care duc la formare de lactat de fier, colorat în galben-verzui (de exemplu reactivul Berg, reactivul Uffelmann).



A. Hipersecreţie



B. Stomac normal

Fig. 100. Curba de aciditate

Scanned with OKEN Scanner

BILA

Bila este produsul de secreţie externă a ficatului. Cantitatea de bilă secretată în condiţii fiziologice variază între 800—1 000 cc în 24 de ore. Are o compoziţie complexă, care variază după cum avem de a face cu bila obţinută din vezicula biliară sau cu bila obţinută cu ajutorul fistulei, înainte de a ajunge în vezicula biliară. Aspectul bilei hepatice diferă deasemenea de acela al bilei veziculare; bila hepatică este clară, galbenă-aurie, aproape izotonică cu sângele; bila veziculară este turbure (din cauza resturilor epiteliale şi a sărurilor de calciu), filantă din cauza mucinei, pe care o conţine în cantitate mare, şi de culoare verde-brună.

Compoziţia bilei

Tabelul 17

Valori exprimate în proporţii la 1 000

	Bila hepatică	Bila veziculară		Bila hepatică	Bila veziculară
Apă	976,0	860,0	Grăsimi neutre	0,8	1,5
Substanţe solide	24,0	140,0	Colesterol	0,8	5,7
Acizi biliari	5,7	53,7	Fosfatide	0,5	2,2
Mucină şi pigmenţi	8,1	41,4	Săruri minerale	7,4	8,5
Lipide totale	2,9	18,8	pH	8-8,6	6
Acizi graşi	0,8	8,5			

Greutatea specifică a bilei variază între 1,010—1,040; are Δ crioscopic — 0,56°.

Bila din vezicula biliară este mai concentrată decât bila recoltată prin fistulă. Principalii constituenţi ai bilei sunt sărurile biliare, sărurile alcaline ale acizilor glicocolic şi taurocolic, lipidele, mucina şi pigmenţii biliari.

Acizii biliari se pot împărţi în două grupe: grupa acidului glicocolic $C_{26}H_4NO_6$ şi grupa acidului taurocolic $C_{26}H_{43}NSO_7$.

Acizii glicocolic şi taurocolic sunt prezenţi în cantităţi egale în bila umană şi la ierbivore după unii autori, după alţii în bila umană predomină acidul glicocolic. La carnivore şi la câine se găseşte exclusiv acid taurocolic. Precursorul acidului colic în organism este colesterolul, fapt dovedit cu ajutorul colesterolului conţinând deuteriu.

Nu se cunoaşte locul de formare a acizilor colici; se ştie că ficatul este locul în care are loc conjugarea taurinei — respectiv a glicocolului — cu acidul colic, dar este foarte probabil că formarea lor este deasemenea o funcţie hepatică. Există dovezi că majoritatea acizilor biliari au un circuit închis în organism. Există astfel aşa numitul ciclu entero-hepatic, prin care sărurile biliare, după trecerea lor în intestin, sunt reabsorbite şi readuse în curentul sanguin port şi apoi în ficat, de unde sunt din nou reexcretate în bilă.

La un animal hrănit cu săruri biliare se regăseşte totalitatea acestora în bila recoltată prin fistulă biliară, ceeace arată că reabsorbţia este aproape completă.

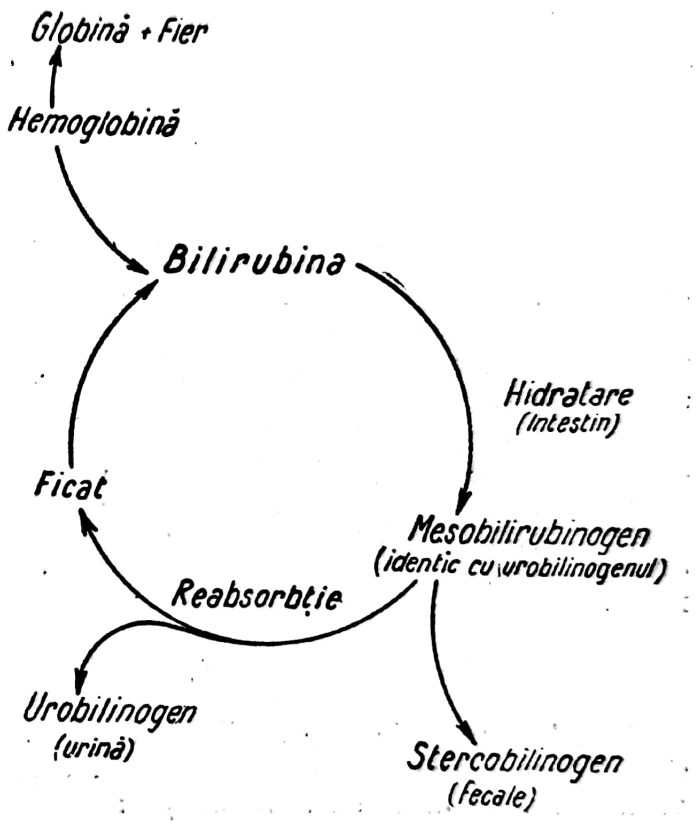
Pigmenţii biliari. Pigmenţii bilei normale sunt bilirubina şi, în cantitate mică, biliverdina. Locul de formare a pigmenţilor biliari este sistemul reticulo-endotelial din diversele regiuni ale organismului, măduva oaselor

Scanned with OKEN Scanner

fiind ţesutul cel mai activ. Origina acestor pigmenţi este hemoglobina (vezi capitolul respectiv), iar rolul lor în digestie nu este precizat. Orice cauză care duce la o distrugere a globulului roşu produce o creştere a cantităţii de pigmenţi biliari. Icterul hemolitic este provocat de un exces de hemoliză, manifestat printr'o mărire considerabilă a cantităţii de pigment elaborat — spre deosebire de icterul mecanic, cauzat de calculii biliari sau de cancerul pancreasului.

Ca şi pentru acizii biliari există şi pentru pigmenţii biliari un ciclu enterohepatic.

Ciclul enterohepatic al pigmenţilor biliari



Lecitina se găseşte în bilă în proporţie de 0,02 — 0,05%. Se găsesc deasemenea acizi graşi şi săpunuri. Deşi bila conţine acizi graşi liberi şi săpunuri, soluţiile sale sunt perfect limpezi — graţie proprietăţii importante a sărurilor biliare de a solubiliza aceşti compuşi.

Colesterolul (0,04-6,16%) se găseşte în bilă sub formă liberă, nu sub formă de esteri. Capacitatea bilei de a menţine colesterolul în soluţie este datorită în mare măsură sărurilor biliare. Pentru ca acesta să fie sub formă solubilă în bilă, trebue ca raportul colesterol/săruri biliare să fie mai mare de 1/13 (normal 1/20—1/30); în aceste condiţii, colesterolul precipită, fapt important în formarea calculilor biliari. Bila constitue o cale de eliminare a colesterolului, care se resoarbe din sânge la nivelul veziculei hepatice.

Pentru menţinerea în soluţie a colesterolului este deasemenea importantă concentraţia acizilor graşi.

Mucina din bilă este secretată de celulele epiteliale ale mucoasei veziculei şi canalelor biliare.

Compoziţia minerală a bilei este dată de clor bicarbonaţi fosfaţi, iar dintre cationi sodiu şi în cantitate mică potasiu; calciul se găseşte în proporţie din plasma sanguină, intrând în componenţa calculilor biliari. Bila veziculară, este, în general, mai săracă în substanţe minerale decât bila hepatică, dar mai bogată decât aceasta din urmă în substanţe organice.

Calculii biliari sunt concreţiuni care se formează destul de frecvent în vezicula biliară. Pot fi mai multe tipuri de calculi biliari: *calculi de colesterol pur*, ca o manifestare a cristalizării anormale a colesterolului,

calculi puri de bilirubină şi calculi mixşti: *calculi de calciu-colesterol, colesterol-calciu — pigmenţi biliari, calculi de calciu — pigmenţi biliari* şi *calculi din carbonat de calciu*. Ultimii sunt rari la om, frecvenţi la bovidee. Mecanismul de producere a calculilor biliari nu este bine cunoscut, dar se cunosc o serie de factori, care pot favoriza formarea acestora: stagnarea bilei, infecţiile, turburări în metabolismul colesterolului, staza bilei sau o acidificare a bilei, care favorizează depozitarea sărurilor de calciu (carbonat de calciu).

Funcţiile bilei

sunt importante. Bila este un vehiculant al unor produse de degradare (pigmenţi biliari, etc.), are rol excretor, are rol esenţial în digestia grăsimilor de către sucurile intestinal şi pancreatic, prin acţiunea de stimulare a activităţii lipazelor pancreatică şi intestinală şi în absorbţia grăsimilor, datorită sărurilor biliare care au capacitatea de a scoborî tensiunea superficială la nivelul suprafeţelor de contact dintre apă şi globulele de grăsime. Rolul bilei ca agent emulsionant apare astfel ca foarte important. După Vérzar, acizii graşi se unesc cu sărurile biliare formând compuşi complecşi, formă sub care se absorb din intestin.

Bila are capacitate hidrotropă şi ca lichid de tamponare, are rol important pentru menţinerea echilibrului ionic în cursul proceselor fiziologice ale digestiei.

Bila nu are nicio activitate enzimatică, astfel că rolul ei este în special fizic, mecanic, sau în cazul lipazelor, de activator al acestora.

Bila absorbită per os are acţiune colagogă (acţiune de stimulare a secreţiei biliare). Printre substanţele colagoge se cunosc: insulina, sulfatul de magneziu, salicilatul de sodiu, salolul, podofilina, evonimina, fizostigmina.

SUCUL PANCREATIC

Sucul pancreatic este un lichid incolor, clar, vâscos, alcalin (pH > 8). Compoziţia lui este redată în tabelul următor (vezi tabelul 18), dar ea variază foarte mult cu alimentaţia:

Tabelul 18

Greutatea specifică	1,008—1,015	Substanţe solide totale	1,58 g %
Δ crioscopic	0,61⁰—0,62⁰	Proteine totale	0,5 g %
pH	8,3	Substanţe minerale	1,58 g %
Alcalinitatea exprimată în nr. cc NaOH n/10 corespunzător la 10 cc suc pancreatic	12,7%	Cloruri	0,30 g %

Conţine proteoze, peptone, urme de nucleoproteide substanţe minerale printre care predomină sodiul, clorul şi bicarbonaţii (aceştia din urmă în concentraţie aproape de cea normală). Conţine o serie de enzime, este sursa cea mai importantă de enzime digestive: tripsina, chimotripsina, carboxipeptidaza, polinucleotidaza, amilaza, lipaza. Conţine astfel enzime care acţionează asupra celor trei grupe de alimente: glucide, protide, lipide.

Scanned with OKEN Scanner

Enzimele din sucul pancreatic

Enzimele proteolitice. Există două proteinaze în sucul pancreatic: *tripsina* şi *chimotripsina*. Ambele sunt endopeptidaze. Tripsina se găseşte sub forma inactivă, de tripsinogen. Şcepowalnicov, în laboratorul lui Pavlov, a arătat primul activarea tripsinogenului sub acţiunea enterokinazei din sucul intestinal (enterokinaza este de natură enzimatică). Tripsinogenul poate fi activat de urme de tripsină, activarea autocatalitică fiind accelerată de prezenţa sărurilor de calciu, probabil prin activarea unei prokinaze într'o kinază activă. Chimotripsina se găseşte şi ea sub forma inactivă de chimotripsinogen şi este activată de tripsină, dar nu şi de enterokinază. pH-ul optim de acţiune al ambelor enzime=8. Acţiunea tripsinei asupra proteinelor duce la o degradare mai avansată decât acţiunea pepsinei. Digestia preparativă a proteinelor de către sucul gastric favorizează acţiunea tripsinei, degradând proteozele şi peptonele în fragmente mai mici, peptide cu moleculă mică. Pepsina, tripsina şi chimotripsina lucrează asupra legăturilor peptidice îndepărtate de gruparea terminală, sunt endopeptidaze.

Carboxi-, *amino-* şi *dipeptidazele* din sucul gastric sunt exopeptidaze (vezi capitolul enzimelor); ele catalizează reacţiile de scindare a moleculelor mici rezultate din degradarea pepsinică, respectiv, tripsinică, acţionând asupra legăturilor peptidice terminale.

Amilaza pancreatică acţionează asupra amidonului, care trece prin aceleaşi stadii ca şi sub acţiunea amilazei gastrice, este însă mai activă decât aceasta, digeră şi amidonul nefiert. Are pH-ul optim = 6,7—7, ionul Cl^- fiind esenţial pentru acţiunea ei.

Lipaza pancreatică catalizează reacţia de scindare hidrolitică a grăsimilor neutre în glicerol şi acizi graşi:

$$\underset{\text{palmitat}}{C_3H_5(C_{15}H_{31}COO)_3} + 3\,H_2O \rightarrow 3\,\underset{\text{acid palmitic}}{(C_{15}H_{31}COOH)} + \underset{\text{glicerol}}{C_3H_5(OH)_3}$$

$$\underset{\text{tristearină}}{C_3H_5(C_{17}H_{35}COO)_3} + 3\,H_2O \rightarrow 3\,\underset{\text{acid stearic}}{C_{17}H_{35}COOH} + \underset{\text{glicerol}}{C_3H_5(OH)_3}$$

Sărurile biliare, prin acţiunea lor tensioactivă, stimulează emulsionarea grăsimilor, ceeace permite un contact mai larg între substrat şi enzimă, deci o activare indirectă a acestora din urmă. Lipaza pancreatică este cea mai activă enzimă lipolitică din tractul digestiv. In absenţa acestei lipaze sau în caz de obstrucţie a canalului pancreatic, grăsimile trec nedigerate în fecale. Secreţia sucului pancreatic este sub control neurohormonal.

Din mucoasa intestinală s'a reuşit izolarea unei substanţe care, inoculată intravenos, este capabilă de a stimula secreţia pancreatică. Această substanţă ar fi precursorul unui hormon prosecretor, precursorul *secretinei*, prosecretina; aceasta, sub acţiunea acidităţii din sucul gastric, este transformată în secretină, care trece pe cale sanguină în pancreas, stimulând secreţia gastrică. Secretina ar fi un stimulent direct al celulelor glandulare.

S'a reuşit prepararea secretinei sub formă cristalizată; este o substanţă de natură proteică (conţine histidină şi arginină) cu greutate moleculară = 5 000.

Cercetările importante ale lui Pavlov asupra secreţiei pancreatice au indicat că există o *cale nervoasă de excitare* a secreţiei pancreatice. Secreţia

este stimulată prin excitarea vagului, care produce un suc pancreatic bogat din punct de vedere enzimatic; se pare că secreţia de enzime este sub controlul vagului, pe când acţiunea secreţiei creşte conţinutul în apă şi constituenţi anorganici.

Pavlov a arătat că şi în secreţia pancreatică, ca şi în secreţia gastrică, secreţia are loc pe cale reflexă.

SUCUL INTESTINAL

Compoziţia chimică a sucului intestinal variază extrem de mult cu diversele condiţii.

Sucul intestinal are greutatea specifică 1,010; pH = 8,3; Δ crioscopic = — 0,62°. Are un conţinut destul de mare în ClNa şi $NaHCO_3$; este un lichid limpede, albicios sau gălbui. Conţine activatorul tripsinei, enterokinaza, o serie de enzime — peptidaze (constituind complexul erepsină), carbohidraze (zaharază, maltază, lactază, urme de amilază), lipază, nucleotidaze, fosfataze.

Peptidazele din sucul intestinal cuprind o serie de enzime care continuă acţiunea sucului pancreatic prin degradarea poli- şi dipeptidelor până la aminoacizi, şi anume sunt aminopeptidaze (pH optim = 8), dipeptidaze şi o polipeptidază care scindează prolina din peptide. Sucul intestinal, prin enzimele lui, nu este capabil să realizeze scindarea hidrolitică a proteinelor, ci numai a peptidelor, complectând astfel acţiunea sucului pancreatic. Prin conlucrarea sistemelor enzimatice, proprii celor două sucuri digestive, se ajunge la produsele finale de degradare a proteinelor alimentare la aminoacizi, formă sub care acestea intră în torentul circulator sanguin, după ce străbat mucoasa intestinală. Acţiunea enzimatică complexă a enzimelor prezente în sucurile pancreatic şi intestinal acoperă pe de o parte, nevoile organismului în aminoacizi, pe de altă parte, elimină specificitatea de origină a proteinelor (în special cele animale), care altfel ar da naştere în organism unor fenomene dăunătoare echilibrului fiziologic (sensibilizare anafilactică, precipitine, etc.).

Peretele intestinal conţine *nucleaze, nucleotidaze, nucleozidaze şi fosfataze* (pH optim = 8,6). Aceste enzime scindează acidul nucleic care a rezistat acţiunii enzimelor sucului pancreatic, conducând la desfacerea nucleotidelor şi apoi la dedublarea acestora în nucleozide şi PO_4H_3. Absorbţia are loc sub forma de nucleozide solubile (bazele purinice sunt insolubile şi, deci, ar fi greu sau deloc absorbabile).

In mucoasa intestinală există arginază, iar în mucoasa intestinului subţire se pun în evidenţă cantităţi mari de fosfatază.

Digestia dizaharidelor se face aproape exclusiv în sucul intestinal, unde sunt transformate în monozaharide, glucoză şi galactoză, formă sub care pătrund în vena portă şi de aci în ficat (refacerea glicogenului).

Zaharaza intestinală are pH-ul optim = 5—7, lactaza = 5,4—6, maltaza = 6,7—7,2.

Sucul intestinal conţine şi o *lipază*, dar în cantitate foarte mică.

Activitatea glandelor intestinale este sub control neuro-hormonal.

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL IV

METABOLISMELE INTERMEDIARE

GENERALITĂŢI

DEFINIŢII, METODE DE CERCETARE

Se înţelege prin metabolism, în sens larg, totalitatea modificărilor chimico-energetice care au loc în celulele şi ţesuturile organismului viu.

Lavoisier (1780) a arătat că aceste schimburi energetice sunt legate de un consum de oxigen şi că acest consum este proporţional cu activitatea organismului.

Lumea din afară împrumută organismului, pentru activitatea lui, alimentele indispensabile vieţii.

Rolul alimentelor în organism este dublu :

1. servesc la înlocuirea componentelor structurale pierdute prin uzură şi la creşterea organismelor tinere ; intervin astfel în constituirea substanţelor plastice şi funcţionale ale organismului ;

2. servesc ca sursă energetică potenţială necesară travaliului cinetic, termic, mecanic, etc.

Energia chimică potenţială conţinută în complexele chimice ale alimentelor este transformată (prin reacţii de scindare, oxidare, etc.), în cursul funcţionării celulare, în alte forme de energie (cinetică, mecanică, termică). *Legea conservării materiei şi legea conservării energiei se aplică şi substanţei vii.* (M. V. Lomonosov).

Se înţelege prin *metabolism intermediar, totalitatea reacţiilor chimice şi fizico-chimice care au loc la nivelul fiecărei celule,* precum şi *totalitatea modificărilor chimice şi fizico-chimice care intervin în schimburile dintre protoplasmă şi substanţele aduse din exterior.*

Metabolismul intermediar cuprinde procesele de *„catabolism"*, adică fenomenele de degradare, de simplificare, pe care le suferă în celulă complexele chimice din alimente, şi procesele de *„anabolism"*, adică de sinteză, de creştere a complexităţii diverselor componente pornind dela altele mai simple.

Modificările catabolice sunt în general asociate cu eliberare de energie din materialul de plecare — poartă deaceea denumirea de reacţii exergonice. O parte din această energie este folosită de organism pentru travaliul său mecanic sau chimic.

Procesele anabolice sunt în general procese consumatoare de energie, sunt endergonice. Acestea utilizează, fie energia eliberată de reacţiile

catabolice, fie energia din lumea exterioară. Numai *organismele autotrofe* au însă această capacitate de a folosi energia exterioară, *organismele heterotrofe*, nu.

METODELE DE STUDIU AL METABOLISMELOR INTERMEDIARE

Studiile mai vechi asupra metabolismului diverselor substanțe din alimentație aveau ca obiect în special produsele inițiale rezultate din complexele chimice ale alimentelor și produsele finale, rezultate din transformarea lor în organism. Cercetări mai amănunțite au arătat însă că între produsele inițiale și cele finale de eliminare există o serie de produse intermediare care își au rolul lor bine determinat și că trecerea nu se face simplu și direct, ci printr'o serie de etape intermediare. *Studiul metabolismelor intermediare se ocupă tocmai cu cercetarea tuturor fenomenelor care se produc între stadiul inițial și cel final*, fenomene care sunt atât de degradare, cât și de sinteză. Studiul metabolismelor intermediare prezintă însă o serie întreagă de dificultăți, datorite în primul rând faptului că produsele intermediare care apar în cursul transformărilor sunt în mod normal, în organism, în cantități extrem de mici și dispar extrem de repede, suferind transformări rapide, astfel că nu pot fi cercetate. Există totuși mai multe metode care permit studiul acestor etape intermediare, metode care se controlează și se complectează reciproc. Aceste metode sunt următoarele :

a) *Hrănirea animalelor cu compuși chimici bine definiți*, considerați, pe bază teoretică, drept compuși intermediari în degradarea unor alimente. Acești compuși se administrează însă cuplați cu anumite componente chimice pe care organismul nu le poate metaboliza și care vor fi eliminate ca atare prin urină, dar de data aceasta cuplate cu componentele „de degradare" ale produsului presupus intermediar, cu care au fost inițial cuplate. Cu ajutorul acestei metode s'a verificat teoria β-oxidării acizilor grași a lui Knoop. (Vom descrie acest proces la capitolul metabolismului acizilor grași). Metoda, deși foarte utilă, este susceptibilă totuși de unele obiecții ; este o problemă deschisă dacă, modificând componenta de plecare, prin cuplare cu o componentă nemetabolizată de organism, soarta ei în organism nu este și ea modificată.

b) *Punerea în contact a acelorași compuși presupuși intermediari în degradarea unor alimente cu fragmente de țesuturi sau extracte tisulare.* Se controlează dacă acești compuși pot fi transformați în produsele finale normale, deci dacă aceste țesuturi conțin complexul enzimatic necesar anumitor transformări metabolice, acelaș complex enzimatic care în organismul intact catalizează aceste transformări. Prin această metodă se face însă o modificare spațială a corelațiilor dintre enzimele, din sistemul original, deoarece arhitectura celulară este modificată ; în plus, o serie de enzime se distrug prin această manipulare.

c) *Metoda organelor izolate și perfuzate.* Se poate studia activitatea metabolică a unui organ dat prin stabilirea unei circulații artificiale și independente a lichidelor lui circulante, introducând în aceste lichide de circulație compușii chimici a căror transformare este urmărită. Se controlează în lichidele de perfuzie produsele rezultate din transformarea acestora.

Organul perfuzat poate fi lăsat „in situ" în animal sau poate fi izolat și menținut în condiții cât mai asemănătoare celor fiziologice. Mediul

de circulație poate fi însuși sângele animalului, sângele unui animal de aceeași specie sau o soluție salină fiziologic echilibrată. Se menține nivelul presiunii cu ajutorul unor pompe mecanice care imită acțiunea inimii și se stabilesc sisteme de oxigenare prin așa numiții „plămâni artificiali". Această metodă a fost utilizată în studiul transformărilor chimice care au loc în plămân, rinichi, ficat. Cu această metodă s'a dovedit depozitarea glicogenului în ficat, sinteza ureei din amoniac, etc.

Soluții fiziologic echilibrate sunt soluțiile care permit funcționarea unor organe izolate, cel puțin pentru un interval de timp. Astfel, Ringer, în 1880, a arătat că o soluție conținând NaCl KCl și Ca Cl_2 poate menține bătăile inimii de broască izolate. Modificând acest mediu prin complectare cu alți ioni, inima izolată poate bate ore și zile întregi. Rezultă faptul important că, pentru întreținerea vieții, constituenții ionici sunt esențiali. Soluții saline au fost folosite pentru a înlocui volumul sanguin în cazul hemoragiilor mari.

Aceste soluții conțin Cl, Na, K, Ca, Mg, fosfați, bicarbonați ele sunt tamponate la un pH adecvat, iar multe din ele conțin glucoză. In general, lichidele de perfuzie trebue să aibă o compoziție salină cât mai apropiată de aceea a sângelui.

Dăm lista componentelor unei asemenea soluții saline fiziologice (Krebs) echilibrate, comparând compoziția ei cu aceea a serului sanguin (vezi tabelul 19).

Tabelul 19

	Ser sanguin	Sol. Fiziologică
Na^+	320	327
K^+	22	23
Ca^{++}	10	10
Mg^{++}	2.5	2.9
Cl^-	370	454
PO_4^{---}	10	11
SO_4^{--}	11	11.4
HCO_3^-	54 vol. %	54 vol. %
CO_2	2.5 vol. %	2.5 vol. %
pH	7.4	7.4

Concentrațiile sunt date în mg % cc
CO_2 în volume % cc
Se adaugă glucoza 0,2% înainte de utilizare

d) *Metoda „sistemelor perturbate"* permite observații și experiențe asupra organismelor la care metabolismul normal este modificat patologic, fie spontan, fie voluntar, de exemplu diabetul spontan sau diabetul provocat prin înlăturarea chirurgicală a pancreasului sau prin injecții cu hormon diabetogen, produsul de secreție al glandei pituitare, sau pseudodiabetul provocat prin injecții de florizină. Toate aceste stări au permis studiul metabolismului acizilor grași și al glucidelor. Perturbarea metabolismului glucidic în toate aceste cazuri duce la o eliminare a glucozei prin urină, pe când în mod normal este depozitată în ficat sub formă de glicogen. A fost astfel posibilă punerea în evidență a stadiului intermediar din degradarea acizilor grași, și anume, a stadiului de acizi cetonici sau corpi cetonici (acidul acetilacetic, acidul β-hidroxibutiric și acetona). Aceștia devin stadiu final în cazul unui metabolism defectuos al glucidelor, deoarece compușii glucidici sunt aceia care pun la dispoziția acizilor grași energia necesară degradării acestora până la stadiul final.

Alt exemplu : alcaptonuria, starea patologică caracterizată prin apariția acidului homogentizinic în urină, indică această componentă ca produs intermediar în metabolismul tirozinei (urina alcaptonuricilor devine brună sau neagră atunci când este expusă la aer, datorită prezenței acidului homogentizinic).

Inhibarea sistemelor enzimatice care catalizează anumite reacții de transformare oprește stadiul transformărilor la anumite faze. De exemplu, prin inhibarea cu fluorură de sodiu sau acid monoiodacetic a enzimelor

Scanned with OKEN Scanner

care intervin în metabolismul glucidelor s'au pus în evidență anumiți compuși intermediari în degradarea lor, produse intermediare, care, în mod normal, fiind extrem de repede metabolizate, nu pot fi surprinse în aceste faze.

e) *Metoda indicatorilor izotopi.* Aceasta este o metodă fizico-chimică și este cea mai interesantă. Ea permite studiul fenomenelor biologice în condițiile firești de funcționare a organismului, pe întreg organismul, fără a produce perturbări artificiale.

Se știe că *izotopii* sunt atomii care au *proprietăți chimice analoage*, dar *greutăți atomice diferite.* Elementele izotope au același număr de electroni periferici, aceeași configurație electronică, ocupă deci în tabloul periodic al lui Mendeleev aceeași poziție, așa dar au proprietăți chimice analoage. Au însă în nucleu un număr diferit de neutroni, au greutăți atomice diferite (greutatea atomică fiind egală cu suma neutronilor și a protonilor din nucleu), de unde proprietăți fizice diferite, care permit tocmai identificarea și diferențierea lor de atomii obișnuiți. Există două tipuri de izotopi utilizați în biologie, *izotopii grei* sau mai corect *izotopii stabili* și *izotopii radioactivi.* Se obișnuește a nota un izotop prin simbolul său chimic la care se scrie sus, în stânga, greutatea sa atomică (și uneori se obișnuește a scrie jos și numărul său atomic). De exemplu, hidrogenul normal $_1^1H$, hidrogenul greu sau deuteriul $_1^2H$ (sau D), oxigenul normal O^{16}, izotopii săi pot fi ^{15}O; ^{17}O; ^{18}O ^{19}O.

Izotopii utilizați în experiențele biologice sunt ^1H, ^2H, H (hidrogen, deuteriu, tritium), carbonul (^{10}C; ^{11}C; ^{12}C; ^{13}C; ^{14}C), azotul (^{13}N; ^{14}N; ^{15}N; ^{16}N;), oxigenul (^{15}O; ^{16}O; ^{17}O; ^{18}O; ^{19}O), fosforul (^{20}P; ^{30}P; ^{31}P; ^{32}P), sulful (^{31}S; ^{32}S; ^{33}S; ^{34}S; ^{35}S; ^{36}S), iodul, sodiul, etc.

Aplicarea metodei izotopilor în cercetările fiziologice este bazată pe următoarele proprietăți :

1. Posibilitatea de a substitui într'un compus un element anumit (O, N, H, P, C) cu un izotop al său capabil de a fi identificat și diferențiat prin proprietățile sale fizice diferite de ale acestuia. In felul acesta se „*marchează*" compusul și poate fi urmărit în cursul transformărilor pe care le poate suferi în organism, și anume : în ce organ se fixează, după ce interval e eliminat, etapele pe care le urmează deplasările între diverșii compuși din organism, etc.

2. In al doilea rând, izotopii, fiind elemente cu proprietăți chimice identice, deci chimic inseparabile, sunt metabolizați de organism în mod identic ; ei vor putea da astfel indicații asupra metabolismului izotopului normal. De altfel s'a constatat că aminoacizii și proteinele naturale conțin în mod normal izotop ^{15}N ca și aerul. Din 10 000 molecule ale unui aminoacid, 37 conțin ^{51}N ca și cele 10 000 molecule de N atmosferic, care conțin 37 atomi ^{15}N.

In rezumat, principiul utilizării izotopilor în studiul metabolismelor intermediare este bazat, pe de o parte, pe posibilitatea diferențierii izotopilor de atomii normali din moleculele compușilor intermediari datorită proprietăților lor fizice diferite și, pe de altă parte, pe metabolizarea identică de către organism a acestor compuși cu a compușilor normali.

Aceste două proprietăți permit urmărirea diverselor transformări pe care le suferă în organism o moleculă conținând diverși atomi izotopi.

Izotopii stabili (sau grei) se pun în evidență cu ajutorul spectrometrului de masă (hidrogenul greu mai poate fi pus în evidență prin trans-

Scanned with OKEN Scanner

formare în apă grea și determinarea densității. Apa naturală are la 20° densitatea 0,99823, cea grea 1,10530, punct de fierbere 105°, 42 în loc de 100°; punct de topire + 3°, 8).

Izotopii radioactivi sunt mai ușor de urmărit în cursul peregrinărilor lor prin diverși compuși, datorită proprietății lor radioactive. S'au preparat o serie de izotopi radioactivi artificiali, prima oară de către soții Joliot-Curie, din atomi neradioactivi (carbon, fier, fosfor). Prin bombardarea cu ajutorul ciclotronului cu particule subatomice (protoni, neutroni, etc.) se produc modificări radioactive artificiale ale elementelor (se cunosc mai mult de 200 de izotopi).

Vom da câteva exemple de utilizare a izotopilor în studiul metabolismelor intermediare.

α) **Folosirea** D. Hidrogenul greu se obține destul de ușor prin electroliza apei: la catod se separă ^1H și apa care rămâne e în special D_2O. Deuteriumul se poate introduce în compușii organici bine definiți. De exemplu, dacă se pune în prezență apa grea, D_2O, cu compuși organici: zaharuri, acizi aminați, cetone, aldehide, alcooli, hidrogenul fixat la grupările OH; COOH; NH_2 poate fi înlocuit cu D, în timp ce H fixat direct la C nu poate fi înlocuit. Dacă se vor hrăni animalele cu substanțe chimice care conțin D, substanțe „marcate", se va putea urmări soarta lor: unde ajung întâi, unde se fixează, când sunt degradate. Pentru identificarea compușilor rezultați se eliberează deuterium sub formă de apă grea și ca atare poate fi recuperat din sânge, urină sau organe, după arderea lor, prin distilare, și identificat prin determinarea greutății specifice.

Deasemenea, utilizarea ^2H ne poate indica și ce sinteze au loc în organism. Dacă se injectează unui animal viu D_2O și i se menține concentrația aproximativ constantă prin aport adecvat de H_2O timp de câteva zile sau săptămâni, substanțele organice formate prin sinteze în această perioadă vor conține D în poziții anume stabilite. Excesul de D nefixat va putea fi eliminat prin spălare, iar substanțele sintetizate în organe vor putea fi arse, distilate și în acești compuși se va putea identifica dacă există D sau H și deci se află ce sinteze au avut loc în organism.

Cu ajutorul deuteriumului, utilizând aceste două tehnici (hrănire cu produse care conțin D și administrarea de D_2O), s'au putut obține rezultate interesante în studiul metabolismului lipoidelor. La animalele hrănite cu acizii grași-nesaturați, care conțin D s'a arătat că în organism are loc o transformare a acestora în grăsimi nesaturate și saturate.

Deasemenea, hrănind animalele (șoareci) cu glucide și menținând constantă concentrația D_2O în organism, s'a obținut colesterol și grăsimi ordinare cu un conținut mare în deuterium, fapt foarte important, deoarece demonstrează sinteza grăsimilor din glucide.

Deasemenea, hrănind cobai și guzgani cu glucoză și fructoză și menținând concentrația D_2O constantă (1—3%), se obține glicogen care conține 3D pentru fiecare moleculă de glucoză. Acest lucru nu are loc dacă se hrănesc animalele cu zaharuri combinate. El arată că sinteza glicogenului se produce după o prealabilă scindare în molecule mai mici.

β) **Folosirea** ^{15}N a fost foarte utilă în studiul metabolismului acizilor aminați. Proteinele din serul animalelor hrănite cu leucină care conținea o cantitate mică de azot greu prezintă, după un interval, un conținut anumit de N izotop. Acest fapt arată că organismul poate sinte-

tiza anumiți acizi aminați, căci izotopul ^{15}N din aceste proteine se regăsește numai 30% în leucină (acid aminat cu care a fost hrănit) și restul de 70% în alți acizi aminați, cu excepția lizinei. Se admite că azotul urinar derivă aproape exclusiv din N alimentar. Totuși hrănirea cu aminoacizi cu N izotop $^{15}_{7}N$ arată că acest $^{15}_{7}N$ izotop se regăsește în majoritate în proteinele din organism. Deoarece greutatea animalelor în experiență nu s'a modificat, se poate deduce că aminoacizii au părăsit proteinele din celule și alți aminoacizi au fost încorporați.

γ) Utilizarea izotopilor radioactivi este de mare folos în cercetările fiziologice din cauza marii ușurințe de a-i identifica și din cauza sensibilității extreme a metodei de depistare. Ca izotopi *naturali radioactivi* s'a utilizat de exemplu Pb radioactiv. Descoperirea radioactivității artificiale de către soții Joliot-Curie a permis prepararea unor izotopi radioactivi ai elementelor normale. S'au putut prepara izotopi radioactivi pentru ^{32}P, ^{24}Na, ^{42}K, ^{56}Mn, ^{45}Ca, ^{59}Fe, ^{14}C, Zn, ^{13}N, ^{31}S, a căror prezență se poate indica cu electrometrul sau mai precis cu comptorul Geiger-Müller. Prin bombardarea elementelor cu protoni, neutroni, deutroni sau particule α, γ, o parte din ei pătrund prin învelișul electronic până la nucleul atomic și scot din nucleu fragmente. Numărul neutronilor sau protonilor din nucleu se modifică și, totodată greutatea atomică; se formează astfel noi elemente. Așa se poate trece dela N la ^{17}O prin bombardarea cu particule α.

Perioada T caracteristică fiecărui element radioactiv este timpul în care activitatea lui e redusă la jumătate din valoarea ei inițială. Dacă viața unui asemenea izotop radioactiv este destul de lungă și radiația lui destul de mare, poate fi utilizat în studiul metabolismului ca indicator radioactiv.

Asemenea experiențe au fost făcute în special cu P. ^{32}P radioactiv se prepară cu destul de mare ușurință și are o viață destul de lungă: în 14 zile pierde numai 1/2 din activitatea lui radioactivă. Deoarece P are o mare importanță într'o serie întreagă de metabolisme intermediare, a fost studiat cu predilecție.

^{32}P radioactiv a fost preparat de Hevsey. Se poate prepara cu ușurință prin bombardarea sulfului din sulfura de carbon cu neutroni ai radiației γ a radiului. Unul din atomii de sulf captează un neutron și emite un proton. Se obține astfel un atom de P greu ^{32}P, fosforul normal izotop fiind ^{31}P.

$$^{32}_{16}S + ^{1}_{0}n = ^{32}_{15}P + ^{1}_{1}H$$

Se mai poate obține ^{32}P prin bombardarea ^{31}P cu deuteron. Utilizarea ^{32}P e importantă, deoarece P joacă un rol atât de însemnat în metabolisme multiple. Această utilizare am spus că este mult ușurată, deoarece: 1) se poate *prepara destul de ușor,* 2) *se poate pune în evidență în cantități extrem de mici* (a milioana parte dintr'o milionime dintr'un gram poate fi decelată), 3) *are o viață suficient de lungă* ca să poată fi urmărit în organism (în 14 zile pierde $^{1}/_{2}$ din radioactivitatea lui).

^{32}P preparat în acest fel e transformat în acid ortofosforic prin oxidare nitrică. Acidul ortofosforic conținând ^{32}P este radioactiv; este utilizabil ca atare sau sub formă de esteri fosforici (ai glucidelor, ai grăsimilor, etc.). Dacă se injectează unui animal în experiență fosfat de sodiu cu un conținut mic în ^{32}P, fosforul marcat dispare din circulația sanguină și se regăsește

cam 1/2 în oase, 1/4 în mușchi, 1/8 în canalul digestiv și ficat. Restul se repartizează în celelalte organe.

Se vede din aceste experiențe că depozitarea are loc tocmai în organele cu rol în metabolismul P. Sărurile de P administrate oral sau parenteral sunt excretate prin intestin sau rinichi.

S'a administrat P radioactiv la găini care depun ouă. După un timp anumit se sacrifică animalul, se dozează P radioactiv din fosfolipide. Se constată că fosfolipidele radioactive sunt formate în ficat, transportate spre ovar și apoi depuse în gălbenușul de ou, ca rezervă.

Utilizarea ^{32}P radioactiv a dus la rezultate extrem de interesante în studiul metabolismului intermediar al glucidelor, urmărindu-se cu ajutorul acestui P „marcat" deplasările lui în diverșii compuși intermediari dela acid adenilpirofosforic la glicogen. În felul acesta s'au putut confirma o serie de date importante.

Iodul radioactiv poate fi pus în evidență în cantități extrem de mici și poate fi urmărită fixarea lui în glanda tiroidă. Se constată că viteza de fixare este mai mare la hipertiroidieni decât la normali și la hipotiroidieni. Cu ajutorul I radioactiv s'a urmărit și distribuția lui în glanda tiroidă. S'a arătat deasemenea că sulfonamidele inhibă transformarea iodului anorganic în iod organic.

S'a reușit deasemenea să se controleze distribuția ^{24}Na, ^{42}K, ^{59}Fe radioactiv, timpul lor de circulație, viața globulului roșu, viteza schimburilor de ioni între diversele lichide, etc.

Utilizarea izotopilor marcați duce astfel la rezultate foarte interesante în fiziologie și patologie.

Cu ajutorul acestor elemente „marcate", care permit să se deosebească elementele introduse de combinațiile identice proprii organismului, s'a putut constata:

1. că ele nu sunt degradate sau eliminate imediat, ci mai întâi sunt încorporate și transformate. Elementele izotope sunt reținute mult timp în organism (de exemplu, chiar după luni de zile s'a putut regăsi P marcat în urină și fecale);

2. că există un schimb continuu între componentele structurale ale organismului și substanțele analoage din alimentație. Cercetări de seamă în U.R.S.S. urmăresc procesul de sinteză al proteinelor în țesuturi cu ajutorul atomilor izotopi. Metoda izotopilor a arătat că în organism există o sinteză și o degradare permanentă a componentelor tisulare.

COEFICIENTUL RESPIRATOR

Arderea complectă în organism a alimentelor ternare, glucidele și lipidele, duce la formarea a două produse finale: CO_2 și H_2O. Controlul formării acestor produse nu este posibil decât pentru CO_2, deoarece apa rezultată nu poate fi deosebită de aceea din lichidele sau alimentele ingerate. Singurul control al combustiei totale este astfel CO_2, eliminat prin plămân. Arderea protidelor, însă, dă ca produse finale, în afară de CO_2 și H_2O, N și S care se elimină prin urină. Controlul ei se face atât pe seama CO_2 eliminat, cât și a componentelor azotate și sulfurate din urină. In orice caz, toate aceste trei clase de alimente influențează schimburile gazoase respiratorii prin oxigenul pe care îl consumă pentru a se degrada complect și prin CO_2 care rezultă din această combustie. Aceste trei clase

de alimente nu consumă în aceeași măsură oxigenul necesar arderii lor și nu elimină în aceeași măsură CO_2 rezultat. Pentru fiecare din aceste trei categorii, valoarea raportului dintre CO_2 eliminat și O_2 consumat pentru combustia lor totală este diferită. Acest lucru este foarte important deoarece, după valoarea acestui raport, se poate deduce care categorie de substanță a fost arsă în organism.

Se numește coeficient respirator, și se notează cu R_Q, *raportul dintre volumul de CO_2 rezultat din combustia unei substanțe oarecare într'un timp dat și volumul de oxigen consumat în același interval de timp* (Regnault, Reisel, Pflüger). Valoarea coeficientului respirator R_Q este diferită pentru cele trei categorii de alimente; pentru glucide $R_Q = 1$; pentru lipide, $R_Q = 0{,}703$; pentru protide $R_Q = 0{,}81$.

Valoarea acestui raport R_Q a fost stabilită experimental lucrând cu substanțe pure (glucide, lipide, protide) și aceste valori se suprapun cu acelea calculate teoretic din formulele acestor corpuri.

De exemplu, *pentru glucide*, oxigenul prezent e suficient pentru a arde tot hidrogenul: molecula glucozei, $C_6H_{12}O_6$, conține hidrogen și oxigen în aceleași proporții ca în apă; ea se poate scrie astfel: $C_6(H_2O)_6$. Oxigenul necesar formării H_2O este în însăși molecula glucozei, deci din afară se ia numai oxigenul pentru formarea CO_2. Deoarece fiecărui atom de C îi corespunde un volum de CO_2 format pentru un volum de O_2 consumat, raportul ar fi:

$$\frac{CO_2}{O_2} = R_Q = \frac{6}{6} = 1.$$

Pentru lipide, acest raport < 1, deoarece ele conțin în moleculă mult mai puțin oxigen decât hidrogen. De exemplu, oleina $C_{57}H_{104}O_6$; tripalmitina $C_{51}H_{98}O_6$.

Cei 98 atomi de hidrogen necesită 49 atomi oxigen pentru a forma 49 molecule de apă. Din aceștia, numai 6 atomi de oxigen sunt în moleculă. Pentru arderea celor 51 atomi de carbon:

$$2\ C_{51}H_{98}O_6 + 145\ O_2 = 98\ H_2O + 102\ CO_2$$

sunt necesari 102 atomi oxigen, deci în total $102 + 43 = 145$ atomi de oxigen sunt consumați și se elimină 102 molecule CO_2.

$$R_Q = \frac{CO_2}{O_2} = \frac{102}{145} = 0{,}703.$$

In cazul protidelor, o parte din C e transformat în CO_2, o parte în *uree*, ducând la eliminarea azotului din moleculă prin urină. Din hidrogenul moleculei, parte e eliminat sub formă de H_2O, parte sub formă de acid sulfuric, formă sub care se elimină prin urină sulful din moleculă. Avem așa dar următoarea reacție de combustie, dacă se ia în seamă formula unei ovalbumine oarecare:

$$2\ \underset{\text{ovalbumină}}{C_{250}H_{409}N_{67}O_{81}S_3} + {}_{532}O_2 = 67\ \underset{\text{uree}}{CON_2H_4} + 269\ H_2O + 433\ CO_2$$

$$R_{Q\ \text{protide}} = \frac{CO_2}{O_2} = \frac{433}{532} = 0{,}814.$$

Este important de notat că aceste valori se aplică cu certitudine organismului viu în ce privește glucidele și lipidele, pentru care reacțiile de ardere sunt acelea indicate în formulele de mai sus. Pentru protide, însă, degradarea nu se face totdeauna conform reacției de mai sus, așa că valorile in vivo sunt în genere în jurul lui 0,8.

Din *determinarea coeficientului respirator se poate deduce astfel natura substanței care a fost arsă.*

Un $R_Q = 1$ va corespunde unei alimentații 100 la 100 cu glucide.

Un $R_Q = 0{,}7$ va corespunde unei alimentații 100 la 100 cu lipide.

Un $R_Q = 0{,}841$ va corespunde unei alimentații care cuprinde 45,7% glucide și 54,3 lipide. Cu cât coeficientul se apropie mai mult de 1, este o indicație că alimentația conține mai multe glucide și cu cât se apropie mai mult de 0,7 cuprinde mai multe lipide.

METABOLISMUL GLUCIDELOR

Glucidele au în primul rând un rol energetic și în al doilea rând un rol plastic. Rolul energetic al glucidelor este primordial.

Organismul animal nu poate sintetiza glucidele din produsele elementare CO_2 și H_2O. Această sinteză se realizează numai de către plante care pun la dispoziția animalelor glucidele gata sintetizate, în special sub formă de amidon.

Procesul de sinteză a glucidelor la plante din CO_2 și H_2O e cunoscut sub numele de *asimilare.*

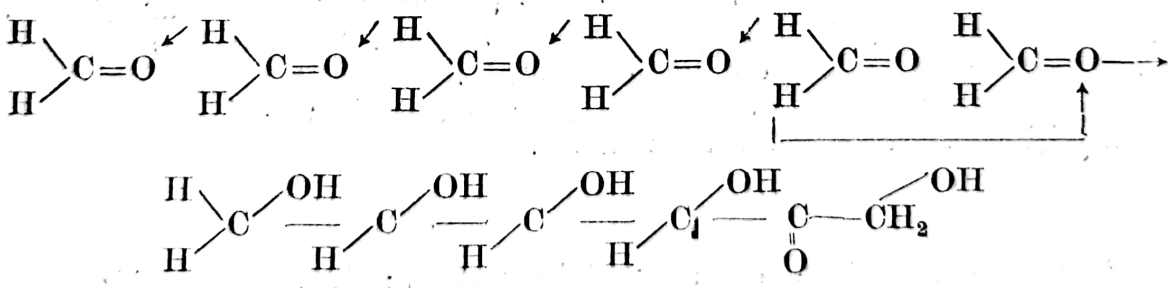
Din punct de vedere fizico-chimic, asimilarea este un proces de reducere. El se petrece în organe speciale care conțin pigmentul clorofila, organe numite cloroplaste. Procesul de „asimilare clorofiliană" este un proces endoterm, se petrece cu absorbție de energie:

$$6\,CO_2 + 6\,H_2O + \text{energie} = C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2,$$

printr'un proces de fotosinteză.

Energia necesară acestei sinteze provine din energia radiațiilor solare și în special dela radiațiile roșii și galbene.

Transformarea CO_2 și H_2O în glucoză nu se face direct, ci prin formarea unui produs intermediar, formaldehida, conform schemei:



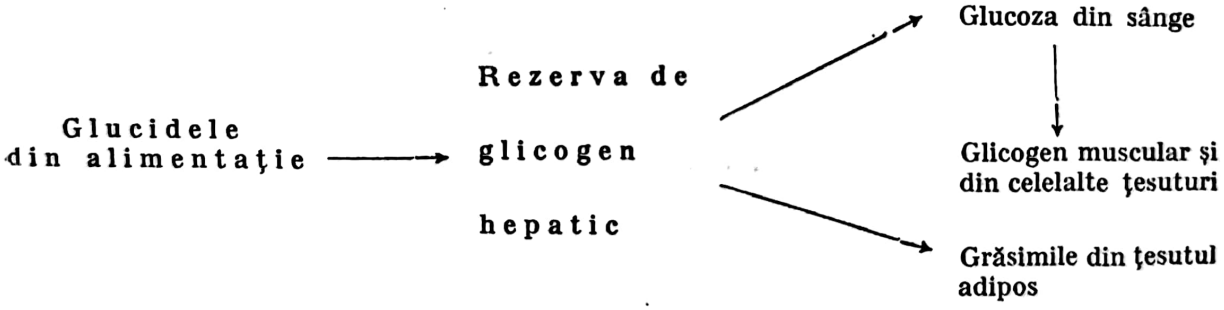
Energia acumulată în glucidele vegetale în timpul sintezei clorofiliene este eliberată în celula animală în cursul degradării lor și utilizată de organism pentru nevoile sale energetice (menținerea temperaturii, travaliu muscular, etc.).

Studiul metabolismului glucidelor cuprinde toate fenomenele care privesc transformarea alimentelor în glucide, necesare organismului, și toate fenomenele care duc la utilizarea acestor glucide de către organism.

Scanned with OKEN Scanner

Organismul animal își procură glucidele necesare în special din glucidele din alimentație, iar în cazul unui aport insuficient sau nul are capacitatea de a sintetiza aceste substanțe din proteine și poate din grăsimi. Există deci o neoformare de glucide în organismul animal, fapt foarte important, care indică pentru fiecare celulă nevoia absolută de glucide pentru desvoltarea normală a fenomenelor vitale. Pentru a avea totdeauna la îndemână glucidele indispensabile, există în organism un depozit central al acestora, și anume, ficatul. De aci, organismul își scoate în măsura nevoilor sale imediate glucidele necesare. Forma sub care se depun glucidele din alimentație în ficat este glicogenul care, datorită insolubilității și structurii coloidale, nu poate dializa prin membranele celulare și rămâne depozitat în celula hepatică. Această formă de depozitare necesită însă o prealabilă transformare a diverselor glucide, o simplificare și o unificare a acestora. Rolul de a simplifica aceste complexe aduse cu alimentele îl are aparatul digestiv. Glucidele pot proveni și din proteinele alimentare. Transformarea proteinelor, respectiv acizilor aminați, în glicogen se face în ficat. Din depozitul central care este ficatul, celulele și țesuturile trebue aprovizionate cu glucidele necesare vieții lor proprii. Calea de aprovizionare este calea sanguină. Prin intermediul sângelui ca mijloc de vehiculare, glucidele se depun în celule, transformate în glicogen propriu, și sunt utilizate pentru nevoile lor energetice. Organul care le utilizează în cea mai mare măsură este mușchiul striat. Dacă cantitatea de glicogen depozitată în ficat și în celelalte țesuturi trece peste o anumită limită, excesul se depozitează în țesutul adipos, unde ulterior e transformat în grăsimi.

Soarta imediată a glucidelor aduse cu alimentele se poate reda schematic astfel :



Soarta finală a lor în organism este adesea de transformare totală, cu formare de CO_2 și H_2O și eliberare de energie. Acest lucru se petrece printr'un șir de procese chimice complicate. Vom analiza pe rând toate transformările pe care le suferă glucidele în organism — și începem dela faza inițială după ingerarea alimentelor.

DIGESTIA GLUCIDELOR

Glucidele introduse cu alimentele pot fi : I. *monozaharide* (oze, zaharuri simple), II. *dizaharide* și III. *polizaharide*.

I. *Monozaharidele* pot fi
- a) *pentoze* : xiloza, arabinoza, riboza, lixoza
- b) *hexoze* : glucoza, fructoza

II. *Dizaharidele* pot fi :
- a) *zaharoza* (din zahărul obișnuit)
- b) *lactoza* (din lapte)

III. *Polizaharidele* pot fi :
- a) *amidonul* (din vegetale)
- b) *glicogenul* (din carne)
- c) *celuloza*, pentozane, din vegetale

Scanned with OKEN Scanner

Dintre aceste zaharuri, singura formă sub care se poate face absorbţia lor în organism este aceea de monozaharide. Rolul de a transforma di- şi polizaharidele în monozaharide îl are aparatul digestiv. In timpul digestiei, sub acţiunea enzimelor digestive, se face o scindare hidrolitică a legăturilor glicozidice din molecula di- şi polizaharidelor cu formare de monozaharide. Intreg travaliul digestiv se rezumă la acest proces. Prepararea alimentelor prin coacere, fierbere, amestecare cu apă, realizează o transformare preliminară. De exemplu, amidonul crud, insolubil, e inatacabil de sucurile digestive; aceste procese îl transformă în dextrine mai uşor atacabile. Travaliul digestiv începe chiar în cavitatea bucală, sub acţiunea *amilazei salivare*, ptialina. Din cauza scurtului contact între alimente şi salivă, această acţiune nu este suficient realizată în cavitatea bucală. In stomac nu există o diastază care să aibă ca substrat glucidele, dar în interiorul bolului alimentar acţionează mai departe diastaza salivară; acţiunea ei nu poate avea loc în porţiunile în contact direct cu peretele stomacal, deoarece pH-ul acid al sucului gastric (HCl) nu permite acest lucru. In interiorul bolului alimentar însă, unde alimentele nu sunt amestecate cu sucul gastric, reacţia e aproape neutră, aşa fel că acţiunea ptialinei se poate continua. Alături de această diastază începe să lucreze şi β-*amilaza pancreatică*. Amilaza salivară şi amilazele pancreatice transformă polizaharidele, amidonul şi glicogenul, numai până la dizaharidul maltoză.

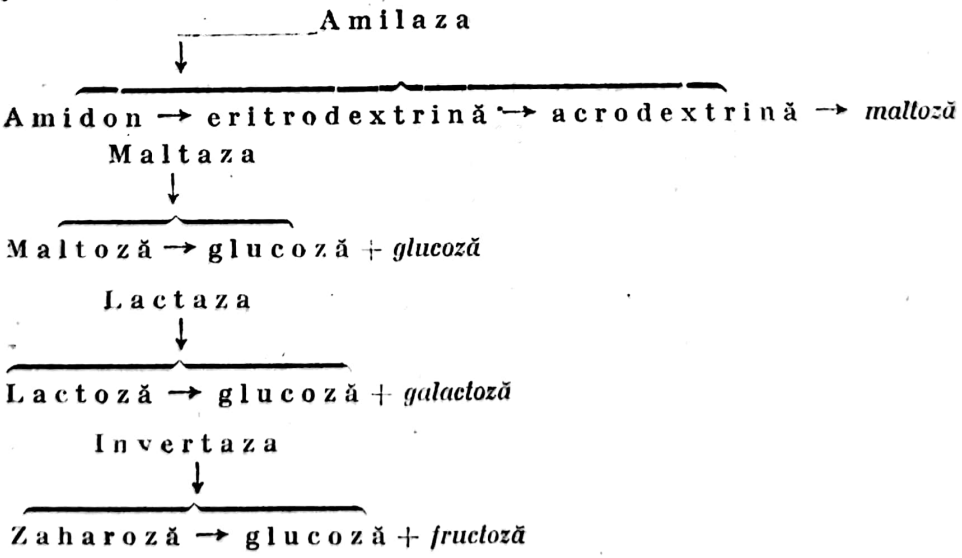
Maltaza o α-glicozidază care se găseşte în sucul pancreatic şi în special în sucul intestinal, transformă maltoza în glucoză.

Dizaharidele nu sunt scindate de către salivă, deoarece aceasta nu conţine diastazele corespunzătoare (conţine maltază în cantitate foarte mică).

Lactoza e dedublată în mucoasa intestinală, şi poate în intestin, sub acţiunea enzimei specifice lactaza, o β-glicozidază (în glucoză şi galactoză).

Zaharoza e dedublată în stomac şi în intestin sub acţiunea enzimei specifice, zaharaza sau invertina (în glucoză şi fructoză).

Se pot *reda schematic* aceste procese de hidroliză enzimatică a glucidelor astfel:



Ca rezultat al travaliului digestiv, din di- şi polizaharide digestibile se formează deci un amestec de monozaharide conţinând hexozele: glu-

coza, fructoza, galactoza. In afară de polizaharide digestibile, alimentele mai conţin şi polizaharide nedigestibile, ca celulozele, pentozanele (xilane, arabane, manane, galactane din plante). Ele nu sunt hidrolizabile de către enzimele digestive prezente la om. Ele trec direct în fecale fără a fi utilizate, fără alt efect fiziologic decât influenţa pe care o au asupra stării fizice a conţinutului intestinal. In cantităţi mici acţionează ca stimulant normal al peristaltismului intestinal; în cantităţi mari produc iritaţii. Ierbivorele pot folosi aceste celuloze datorită microorganismelor simbiotice.

ABSORBŢIA GLUCIDELOR

După scindarea enzimatică a di- şi polizaharidelor în monozaharide urmează absorbţia lor prin peretele intestinal (intestinul subţire), prin care nu pot trece decât monozaharide. *Monozaharidele sunt singura formă sub care se poate face absorbţia glucidelor în organism.*

Viteza de absorbţie depinde de natura monozaharidului. Din analiza conţinutului intestinal la intervale anumite, după administrarea de soluţii pure de zaharuri, acestea se pot orândui astfel în ordinea descrescândă a vitezei lor de absorbţie: *galactoza* > *glucoza* > *fructoza* > *manoza* > > *xiloza* > *arabinoza* > *ramnoza.*

Dacă se notează cu 100 viteza de absorbţie a glucozei, vitezele relative de absorbţie ale diferitelor zaharuri sunt (vezi tabelul 20):

Tabelul 20

	Viteza relativă de absorbţie		
D-galactoza	110	D-manoza	19
D-glucoza	100	L-xiloza	15
D-fructoza	43	L-arabinoza	9

Pentozele sunt absorbite cu aceeaşi viteză ca aceea a substanţelor indiferente (de exemplu, sulfatul de sodiu).

Absorbţia nu e deci un fenomen fizic de simplă difuziune sau osmoză; viteza ei ar depinde de uşurinţa acestor zaharuri de a forma esteri fosforici, deci de un mecanism special, în care este implicat fiecare glucid în parte. Verzar crede că acest mecanism ar fi acela al fosforilării prealabile.

Hexozele formează cu cea mai mare uşurinţă esteri cu acidul ortofosforic, sub acţiunea fosfatazelor din mucoasa intestinală. Formarea lor accelerează atât de mult absorbţia zaharurilor, încât, la câteva minute dela introducerea glucozei în intestinul subţire, zahărul din sânge creşte. Dacă se inhibă fosforilarea cu ajutorul toxicelor specifice (fluoruri, acid monoiod- sau monobromacetic), absorbţia este mult întârziată.

Fosforilarea ozelor în mucoasa intestinală e reglată ca orice fosforilare în general, de hormonul corticosuprarenal.

Că în adevăr fosforilarea accelerează absorbţia, este dovedit şi prin faptul că prin suprimarea fosforilazei cu toxicele specifice de mai sus dispar diferenţele de viteză de absorbţie dintre hexoze (care formează cu uşurinţă esteri) şi pentoze (care formează greu esteri). In aceste condiţii, ele sunt absorbite egal de lent.

Viteza de absorbţie a unei hexoze poate fi modificată de prezenţa altui zahar.

Scanned with OKEN Scanner

Dizaharidele injectate intravenos la un animal sunt eliminate ca atare (lactoza, zaharoza) prin urină, ca şi cum ar fi substanţe complect neutilizabile. Acest lucru se explică prin faptul că hidrolizarea lor în monozaharide de către sucurile digestive neavând loc, dizaharidele nu pot fi utilizate de celule sub această formă.

Polizaharidul glicogenul, injectat intravenos, preîntâmpină hipoglicemia care urmează după hepatectomie, ceeace arată că glicogenul poate fi hidrolizat într'o oarecare măsură în glucoză, chiar în curentul circulator.

Pentozele sunt asimilate, deşi în cantităţi mici; ele sunt compuşi necesari acizilor nucleici.

După absorbţia monozaharidelor prin peretele intestinal, ele sunt trecute ca atare în vena portă, de unde trec în ficat. Acest lucru a putut fi dovedit prin dozările de glucide în vena portă: pe nemâncate, sângele conţine cam 85 mg%, iar după ingerare de glucide această valoare poate creşte până la 400 mg%. Monozaharidele aduse în ficat sunt depozitate aci sub formă de glicogen.

GLICOGENOGENEZA

Studiul metabolismului glucidelor la animale cuprinde în special studiul glicogenogenezei (formarea glicogenului din glucide), al glicogenoneogenezei (formarea glicogenului din componente neglucidice: aminoacizi, glicerol, acid lactic, acid piruvic, etc.) şi studiul glicogenolizei (degradarea glicogenului).

Depozitarea monozaharidelor se face iniţial în ficat, sub formă de glicogen (ceeace se numeşte glicogenogeneză). Acest lucru a fost dovedit prin experienţe efectuate pe organe izolate. Dacă se perfuzează ficatul cu sânge defibrinat căruia i se adaugă diverse glucide, se poate stabili dacă ele dispar din sânge şi dacă glicogenul hepatic creşte. Aceste experienţe au dat un rezultat pozitiv pentru monozaharidele glucoza, fructoza, galactoza, care deci produc glicogen.

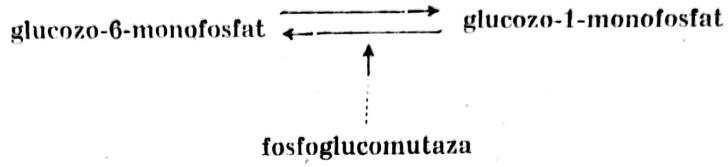
Pentozele nu produc glicogen, deasemenea nici dizaharidele ca atare. Ficatul poate depozita cam 116 g glicogen la 1 000 g ţesut umed. Energia necesară polimerizării glucozei în glicogen este dată de reacţia exotermă de combustie totală a unei mici fracţiuni din aceste monozaharide.

Energia liberă necesară polimerizării a 50 g de glucoză în glicogen este furnizată de arderea a 5,3 g glucoză, adică organismul arde cam 1/10 din zahărul introdus pentru a putea produce energie necesară reacţiei endoterme: glucoză → glicogen, reacţie destul de complexă, cuprinzând mai multe etape.

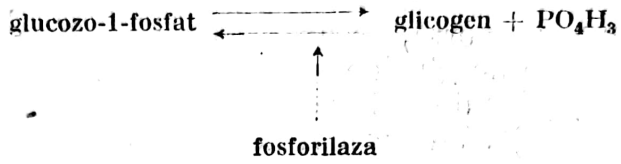
Transformarea glucozei în glicogen, în ficat, este un proces care se realizează în mai multe etape, cu formarea intermediară a hexozofosfaţilor.

Glucoza este fosforilată pe seama acidului adenozintrifosforic (ATF) sub acţiunea catalitică a hexokinazei: glucoză + ATF $\xrightarrow{\text{hexokinază}}$ glucozo-6-fosfat + ADF, cu formare de acid adenozindifosforic (ADF) şi de ester glucozo-6-fosforic. Reacţia se petrece pe seama energiei eliberate de legătura puternic energetică (~P) (10 000—12 000 calorii/mol fosfat) din molecula ATF. Transferul intramolecular al radi-

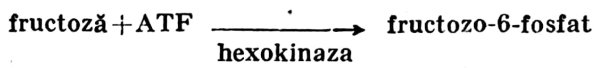
calului fosforic dela C_6 la C_1 are loc sub acțiunea fosfoglucomutazei care necesită prezența ionilor Mg^{++} :



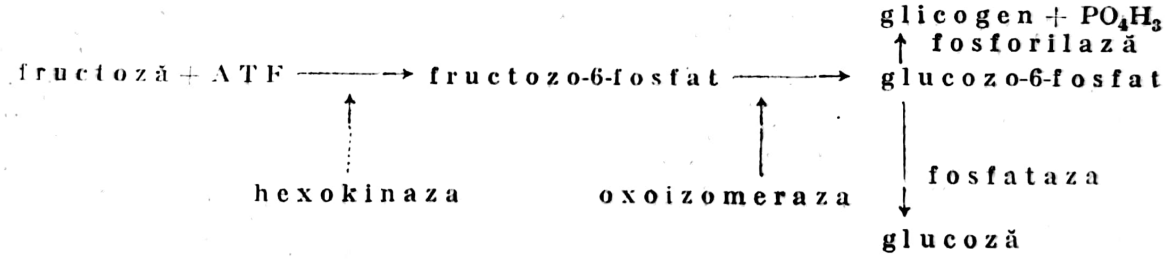
Glucozo-1-monofosfatul, sub acțiunea unei fosforilaze foarte răspândite, este transformat în glicogen. Enzima necesită prezența acidului adenilic (AA) și a Mg^{++} :



Fructoza poate fi deasemenea fosforilată pe seama ATF sub acțiunea catalitică a hexokinazei cu formare de fructofuranozo-6-fosfat :



Acesta, sub acțiunea oxoizomerazei, este transformat în glucozo-6-fosfat. Reacțiile care au loc sunt :



Transformarea celor trei hexoze în glicogen nu se face direct, ci, se crede, prin realizarea unei forme intermediare mai reacționabile.

Transformarea în glicogen nu se face imediat; după Cori, cam în interval de 1/2 oră. Maximul ar fi la 3 ore după aportul exterior de dextroză. In timpul nopții, glicogenul din ficat crește. Ficatul nu transformă monozaharidele cu aceeași viteză în glicogen; cel mai repede e transformată fructoza, cel mai lent galactoza, deci invers decât viteza de absorbție. Ficatul este singurul organ care poate utiliza galactoza ca atare, respectiv, o poate transforma în glucoză pentru a-și putea sintetiza glicogenul. Celelalte țesuturi nu pot face această transformare și nu pot utiliza direct galactoza, ci numai după trecerea ei prin ficat : animalele cărora li s'a extirpat ficatul elimină galactoza complect prin urină. Această capacitate a ficatului de a fi singurul organ care poate face transformarea galactozei în glucoză și utilizarea ei a dus la o metodă de verificare clinică a funcției hepatice, posibilitatea de a face această transformare fiind la rândul ei legată de integritatea celulelor. (Proba este cunoscută sub numele de *proba galactozuriei provocate* : ingestia a 40 g de galactoză la un individ cu un ficat sănătos nu duce la eliminarea acestui zahăr în urină decât în cantități mici, el fiind transformat în cea mai mare parte în glicogen. Cea mai mică leziune a celulei hepatice se traduce imediat printr'o creștere puternică a fracțiunii eliminate).

Fructoza poate fi transformată în glucoză (respectiv glicogen), atât în ficat, cât și în mucoasa intestinală.

Se crede că, pentru a fi depozitată sub formă de glicogen sau pentru a fi degradată, fructoza trebue să fie în prealabil fosforilată. Fosforilarea — după cum s'a arătat anterior — este catalizată de hexokinază sub acțiunea ATF. Extractul muscular nu conține hexokinază, astfel că nu poate acționa asupra glucozei ca atare. Se pare că toate glucidele trebue transformate în glucoză pentru a fi oxidate, deci toate trebue transformate în prealabil în glicogen. Glucoza singură poate fi utilizată direct de unele celule, de exemplu de globulele roșii, dar în general este transformată întâi în glicogen printr'un mecanism asemănător aceluia care are loc în ficat.

Ficatul are capacitatea de a transforma în glicogen și alte substanțe neglucidice, dar care rezultă din degradarea glucidelor (acid piruvic, dioxiacetonă, acid lactic), apoi glicerolul, aldehida glicerică. Ficatul este singurul organ care poate transforma proteinele în glicogen. Neoformarea glicogenului în ficat din protide a fost dovedită experimental. Valoarea glicogenetică a proteinelor variază în raport cu conținutul acestor proteine în acizi aminați glucoformatori.

Se numesc *acizi aminați glucoformatori*, acizii aminați care pot fi transformați de către ficat în glicogen, și anume: alanina, cistina, glicocolul, acidul aspartic, acidul glutamic, arginina, prolina.

Transformarea acizilor aminați în glicogen a putut fi demonstrată prin experiențele pe câini depancreatizați sau florizinici și hrăniți exclusiv cu proteine. Aceste animale elimină zahăr în urină, lucru care nu poate fi explicat decât printr'o depozitare a acestor proteine sub formă de glicogen în ficat. Probabil că produsul intermediar în această transformare este acidul piruvic, ficatul putând sintetiza glicogen din acid piruvic.

Valoarea glicogenetică a proteinelor s'a putut stabili: cam 58 g glucoză pentru 100 g proteine.

Neoformarea glicogenului din lipide nu a putut fi complect demonstrată. Se pare că din glicerolul din molecula grăsimilor s'ar putea să aibă loc o slabă formarea de glicogen.

Transformarea glucidelor în lipide este însă, un lucru bine stabilit.

Când alimentația aduce un exces de glucide, depozitarea glicogenului în ficat atinge un maximum; în acest caz are loc o depozitare a acestuia sub formă de grăsimi în țesuturile adipoase. Acest lucru a putut fi dovedit prin experiențe pe animale hrănite cu o alimentație bogată în glucide și complect lipsită de grăsimi (de exemplu, îngrășarea porcilor, a gâștelor, etc, cu glucide).

Importanța ficatului în metabolismul glucidelor este primordială prin: 1) *rezerva de glicogen* pe care o conține; 2) *prin capacitatea lui de a transforma în glicogen și alte oze* decât glucoza (fructoza, galactoza), celelalte țesuturi neputând utiliza direct decât glucoza; dintre diversele zaharuri sau substanțe glicogenetice, un organism căruia i s'a extirpat ficatul poate utiliza liber numai glucoza, maltoza și glicogenul (ultimele fiind polimere ale glucozei), celelalte glucide trebuind a fi transformate în prealabil în glicogen în ficat pentru a putea fi utilizate; 3) *prin capacitatea lui de a transforma în glicogen proteinele*, el fiind singurul organ care, în cazul unui aport insuficient de glucide, poate pune la dispoziția organismului aceste componente prin transformarea protidelor.

Scanned with OKEN Scanner

Glicogenul nu există numai în ficat, e un constituent normal al tuturor țesuturilor, dar numai ficatul are capacitățile pe care le-am enumerat mai sus.

TRANSPORTUL GLUCIDELOR IN ORGANISM

Glicogenul depozitat în celula hepatică, datorită insolubilității sale, nu trece prin membranele celulare. El e reținut în protoplasma celulară, constituind aici rezerve de glucide pentru întreg organismul. Din acest depozit central de glucide, ficatul transformă glicogenul, pe măsura necesităților, în glucoză, care, fiind solubilă, poate trece prin membrana celulară în sânge, ce o transportă mai departe tuturor celulelor. *Calea de transport a glucidelor în organism este deci calea sanguină*, iar forma de transport este așa zisul *zahăr sanguin* sau *glucoza sanguină*. Zahărul din sânge rezultă din glicogenul hepatic printr'un proces enzimatic de depolimerizare, așa numita glicogenoliză hepatică (dar nu sub acțiunea unei amilaze), în care *cercetările din ultima vreme arată ca prim proces chimic un proces de defosforilare și fosforilare reversibilă*, așa cum vom vedea că se petrece și în glicogenoliza musculară.

Glicogenul în prezența acidului fosforic și sub acțiunea unei fosforilaze, este transformat într'un ester fosforic al glucozei. Acesta, sub acțiunea fosfatazei, e transformat în glucoză și acid fosforic.

Distribuirea glicogenului în țesuturi. Glicogenul din toate organele provine tot din glicogenul hepatic; este adus acestor organe pe cale sanguină sub forma zahărului sanguin. Din acesta, fiecare celulă își sintetizează glicogenul propriu. Acest glicogen propriu nu reprezintă, ca acela hepatic, o formă de depozitare pentru întreg organismul, ci un aliment al fiecărui țesut în parte, care îl utilizează ca sursă energetică imediată pentru desfășurarea activității lui proprii. Glicogenul este astfel prezent în toate celulele, însă în concentrații foarte variabile. Mușchiul striat, fiind organul care are cea mai mare nevoie de substanțe glucidice, conține cea mai mare cantitate (afară de ficat, care însă îl acumulează sub formă de rezervă și nu ca sursă energetică proprie): are 21,96 g $^0/_0$ țesut proaspăt față de 116 g / cât $_{00}$ e în ficat. Prin răspândirea mare în organism, mușchiul reprezintă însă cam 45% din glicogenul total. Celelalte organe conțin infinit mai puțin: sângele 0,4 g $^0/_{00}$, creierul 1 $/_0$. *Glicogenul hepatic este sursa indirectă a glicogenului tuturor țesuturilor, glucoza sanguină fiind sursa lui directă.* Ritmul transformărilor glicogenului hepatic în zahăr sanguin este sub dependență neuro-hormonală (insulina, adrenalina) și e controlat și dirijat de însuși nivelul glicemiei, după cum vom vedea în cele ce urmează. Glicogenul hepatic suferă o fosforoliză cu formare de α-glucozo-1-fosfat, care este repede defosforilat de către o fosfatază hepatică cu formare de glucoză, din care — se crede — provine glucoza sanguină.

Zahărul sanguin

Zahărul sanguin este forma de transport a glucidelor hepatice spre celelalte celule și organe, calea de transport fiind calea sanguină. Nivelul zahărului sanguin, adică valoarea glicemiei, este impresionant de constantă. Variază la normali între 0,70—1,20 g$^0/_{00}$ sânge, determinat sub formă de zahăr

reductor. Intre sângele arterial (deci periferic) şi sângele venos, diferenţele sunt foarte mici. Eritrocitele conţin ceva mai puţin zahăr reductor decât plasma. Zahărul din sânge există în cea mai mare parte sub formă liberă, o cantitate foarte mică este legată de proteine. In ceeace priveşte natura acestui zahăr sanguin, se ştie că este o dextrohexoză, după unii o glucopiranoză, după alţii o glucofuranoză.

Menţinerea constantă a glicemiei este unul din fenomenele cele mai interesante ale fiziologiei. Intr'adevăr, în organism există infinit de multe cauze care ar trebui să modifice valoarea glicemiei, şi totuşi ea rămâne în limite extrem de stabile. Acest lucru nu se poate explica decât prin existenţa unui mecanism de reglare extrem de precis. Intre degradarea glicogenului hepatic în glucoză sanguină şi sinteza acestui glicogen în ficat există un echilibru chimic, datorită căruia nivelul glicemiei este menţinut mereu în limitele normale.

Cauzele exterioare care pot modifica glicemia sunt permanente şi multiple :

1. Supraalimentaţia cu glucide şi protide. Se ştie că fiecare perioadă de absorbţie intestinală ar trebui să ducă la o creştere a glucozei sanguine ; acest lucru nu se întâmplă însă decât în măsură foarte mică ; în schimb, se constată o depozitare mai mare de glicogen hepatic.

2. Inaniţia prelungită ar trebui să ducă la o scădere a glucozei sanguine.

3. Efortul muscular excesiv, ar trebui deasemenea să ducă la o scădere a glicemiei ; or, în cazuri normale, acest lucru nu se întâmplă ; se produce doar o sărăcire în glicogen hepatic.

Variaţiile glicemiei în raport cu alimentaţia au făcut pe clinicieni să stabilească o curbă a glicemiei şi glicozuriei, care poate da indicaţii asupra bunei sau proastei funcţionări a ficatului, respectiv asupra capacităţii sale pe de o parte de a depozita glicogenul, şi pe de alta de a-l transforma în glucoză sanguină. Curba glicemiei după aport excesiv de glucide, aşa numita *curbă a glicemiei provocate*, are la indivizii normali o anumită alură ; la indivizii cu un metabolism glucidic (hepatic) defectuos, aspectul ei diferă şi poate da anumite indicaţii. In proba hiperglicemiei provocate se dă unui individ să ingereze 50—100 g glucoză sau 40 g galactoză ; se fac prize de sânge din 1/2 în 1/2 oră timp de 3 ore. La indivizi normali, glicemia este crescută (1,70—2 g $^0/_{00}$) numai în prima jumătate de oră, apoi revine la normal. La indivizii cu insuficienţă pancreatică sau hepatică nu revine la normal şi apare concomitent glicozuria. Apariţia de glucoză în urină poate fi datorită, fie unei toleranţe scăzute pentru zahăr, fie unei creşteri a permeabilităţii renale pentru zahăr. Pragul de eliminare renală a zahărului sanguin este la normali de 2 g. Creşterea glicemiei mai depinde şi de natura zahărului ingerat, respectiv de viteza de absorbţie a zahărului ; astfel, galactoza duce la cele mai mari creşteri ale glicemiei, fructoza, la cele mai mici.

Alţi factori care pot influenţa glicemia sunt : frigul, emoţiile, efortul muscular, diverşi ioni, ca de exemplu Ca sub formă de $CaCl_2$, K ; adrenalina creşte glicemia, insulina o scade.

Extirparea ficatului, a pancreasului, duce la hiperglicemie ; extirparea hipofizei, tiroidei, la hipoglicemie. In stare agonică se constată hipoglicemie. Hiperglicemia întovărăşeşte adesea şi alte stări de boală : nefrite, hipertensiune.

Scanned with OKEN Scanner

Reglarea glicemiei

Menţinerea nivelului glicemiei la valoarea normală (0,8—1,20 g‰) este foarte importantă, deoarece glucoza sanguină constitue sursa imediată a glicogenului din toate celulele. Toate celulele îşi iau glucoza necesară formării glicogenului lor propriu din zahărul sanguin. Deoarece zahărul sanguin se intercalează între glicogenul hepatic şi cel din ţesuturi, nivelul lui va depinde pe de o parte de rezerva de glicogen din ficat şi respectiv de debitul acestui glicogen în sânge, iar pe de altă parte, de consumul glicogenului din ţesuturi şi în special din ţesutul muscular, care consumă cea mai mare cantitate de glicogen. Reglarea glicemiei (fig. 101) va fi deci funcţie de :

1. *reglarea glicogenezei hepatice* (formarea şi depozitarea glicogenului în ficat);
2. *reglarea glicogenolizei hepatice* (degradarea glicogenului hepatic în glucoză) precum şi de
3. *reglarea glicogenolizei în ţesuturi* şi în special în ţesutul muscular.

Cât timp între rezerva de glicogen hepatic şi glicogenoliza hepatică, pe de o parte, şi consumul de glicogen în organe, pe de altă parte, există un echilibru dinamic, nivelul glicemiei se va menţine în limite normale. Modificări ale valorii glicemiei indică un desechilibru între aceste sisteme, un desechilibru între capacitatea de depozitare sau de scindare a glicogenului hepatic şi capacitatea de consumare, de degradare a glicogenului în organe.

Mecanismele de reglare a glicemiei vor trebui astfel să-şi exercite acţiunea asupra acestor procese chimice, să le coordoneze, fapt care, în mod normal, se realizează atât de perfect, încât între glicogenul hepatic, zahărul

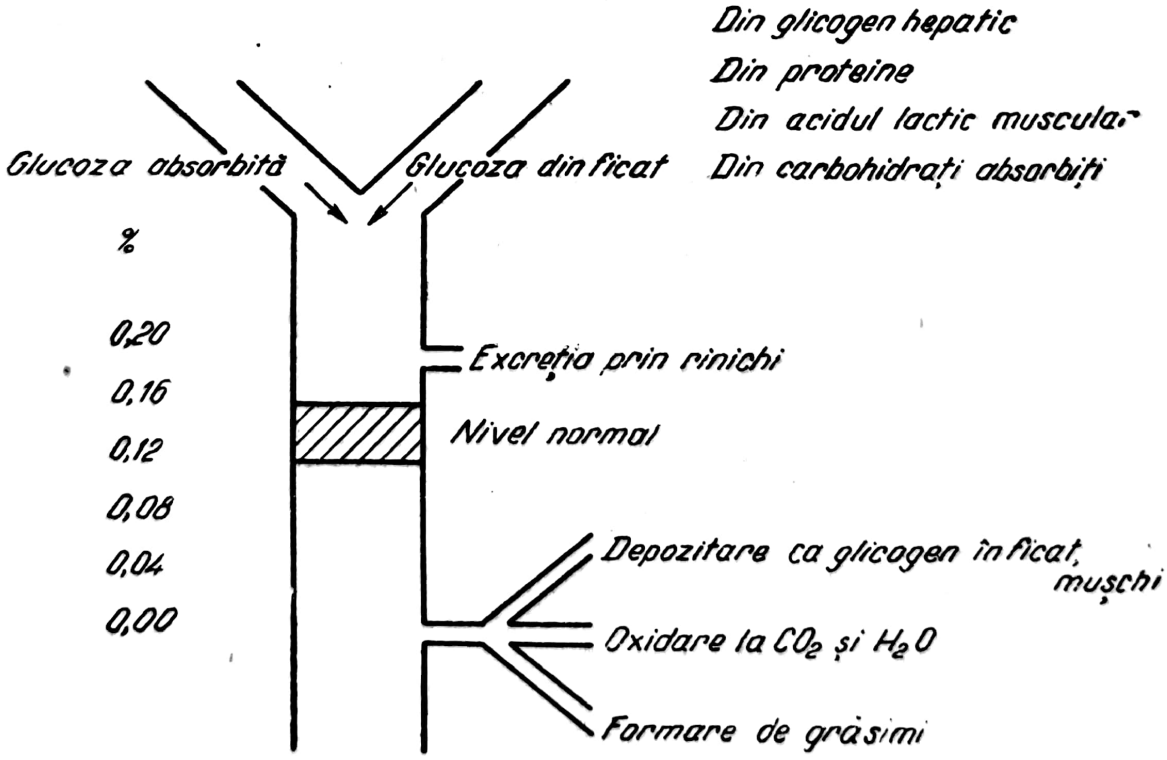


Fig. 101 Schema reglării glicemiei.

sanguin şi glicogenul muscular există un schimb continuu, în acord cu resursele şi necesităţile de fiecare clipă ale organismului.

Mecanismul acesta de reglare este sub dependenţa neurohormonală şi indicatorul funcţionării perfecte a acestui mecanism este menţinerea nivelului glicemiei în limitele normale.

Vom analiza deci în detaliu întregul complex al acestui mecanism.

Mecanismele de reglare a glicemiei

Nivelul glicemiei este acela care declanşează sistemele glicoregulatoare.

Deoarece variaţiile glicemiei (fiziologice sau patologice) pot fi în sensul unei creşteri a zahărului sanguin sau în sensul unei scăderi a acestuia, există în organism două grupe mari de mecanisme de reglare, şi anume : mecanisme de reglare prin acţiune hipoglicemiantă şi mecanisme de reglare prin acţiune hiperglicemiantă. Aceste două acţiuni de reglare antagoniste pornesc dela

A. *sistemul pancreatico-duodenal*, şi dela

B. *sistemul cerebro-hipofizo-adrenalinic.*

Sistemul reglator pancreatico-duodenal acţionează în special prin eliberare de insulină.

Sistemul reglator cerebro-hipofizo-adrenalinic acţionează în special prin eliberare de adrenalină şi contrainsulină, hormoni fundamentali ai metabolismului glucidelor, cu acţiune antagonistă asupra lui.

1. **Reglarea cu efect hipoglicemiant** porneşte dela insulină. Efectul hipoglicemiant al insulinei este o consecinţă a acţiunii acestui hormon asupra următoarelor mecanisme :

a) *stocajul lacunar al glucozei* (adică stocarea temporară a excesului de zahăr sanguin în spaţiile lacunare, de unde este apoi redat lent şi progresiv circulaţiei generale). Insulina ar acţiona asupra acestui stocaj în sensul unei deschideri a spaţiilor lacunare pentru depozitarea glucozei în exces ;

b) *glicogenopexia* (sinteza glicogenului). Insulina stimulează sinteza şi depozitarea glicogenului în ficat şi în muşchi, inhibă glicogenoliza ;

c) *utilizarea glucozei în ţesuturi*, pe care o favorizează ;

d) *transformarea glucidelor în lipide*, proces stimulat de insulină.

Se pare că ar întârzia proteoliza în ţesuturi şi desaminarea în ficat şi, prin aceasta, ar scădea formarea glicogenului din proteine.

Mecanismul acţiunii insulinei asupra acestor procese chimice nu este perfect cunoscut. Lucrări recente ar indica acţiunea acestui hormon asupra unor enzime cu acţiune fosforilantă care intervine în metabolismul glucidelor, cum este hexokinaza, care am văzut că este enzima care catalizează reacţia de fosforilare a glucozei în ester glucozo-6-fosfat, „donatorul grupării fosfat" fiind ATF. Insulina ar împiedica acţiunea inhibitoare a principiului antefizar din glanda pituitară asupra acestei enzime. Anumite extracte ale pituitarei anterioare au o puternică acţiune de inhibare asupra hexokinazei, având deci un efect antagonist cu al insulinei. Acest lucru este important, deoarece depozitarea şi metabolizarea glucozei necesită o prealabilă fosforilare, care are loc sub acţiunea hexokinazei : o inhibare a acesteia duce la o scădere a metabolizării şi depozitării glucozei. Combinarea tuturor acestor procese are drept consecinţă o scădere rapidă a nivelului glicemiei.

Scanned with OKEN Scanner

Tot în cadrul reglării glicemiei prin efect hipoglicemiant trebue amintită şi acţiunea altor glande cu secreţie internă; timusul, paratiroida, precum şi reglarea prin eliminare renală.

Reglarea prin eliminare renală nu intervine însă în reglarea fiziologică normală a hiperglicemiilor, ci numai în hiperglicemiile patologice. In mod normal, intervenţia celorlalte mecanisme cu acţiune hipoglicemiantă mai rapidă este suficientă pentru a preîntâmpina hiperglicemia. Alt fapt care explică dece în mod curent nu se face uz de acest mecanism este acela că glucoza nu se elimină în mod normal prin urină decât când valoarea glicemiei depăşeşte o anumită limită, permeabilitatea renală pentru glucoză fiind în funcţie de pragul de eliminare al acestei substanţe. (Se înţelege prin „prag renal de eliminare al unei substanţe", concentraţia ei minimă în sânge, dela care începe eliminarea acesteia în urină). Pentru glucoză, pragul renal la normali hrăniţi cu alimentaţie excesivă de glucide este între 1,40—1,90 g% cc sânge. In cazuri patologice, însă, pragul renal de eliminare este scăzut, aceasta datorită unei creşteri a permeabilităţii renale pentru glucoză şi nu unei hiperglicemii foarte mari. In *glicozuria florizinică*, provocată de o intoxicaţie cu florizină, apare glucoză în urină datorită unei inhibări a resorbţiei glucidelor în tubii renali, prin inhibarea procesului de fosforilare. Există deasemenea glicozurii renale fără hiperglicemie, datorită unei permeabilizări a ţesutului renal pentru glucoză, în urma unor leziuni renale. Determinarea curbei de toleranţă pentru glucoză poate indica dacă avem de a face cu un diabet renal sau nu, în diabetul zaharat eliminarea glucozei în urină fiind o consecinţă a nivelului ridicat al glucozei sanguine şi nu al unei alterări renale. Există glicozurii emotive, datorite de fapt unei hiperglicemii primare provocate de o suprasecreţie adrenalinică sub impuls nervos. In acelaş ordin de fenomene este glicozuria provocată prin înţeparea bulbului la nivelul planşeului celui de al IV-lea ventricul (experienţa clasică a lui Claude Bernard). Şi această glicozurie este datorită unei hiperglicemii, a cărei valoare întrece pragul de eliminare normal. Pentru celelalte zaharuri decât glucoza, nu există prag renal, ele nefiind utilizate ca atare de ţesuturi, ci eliminate imediat în urină, dacă ficatul nu le-a transformat în prealabil.

2. **Reglarea cu efect hiperglicemiant.** Aceste mecanisme se exercită asupra proceselor chimice care ar putea realiza o eventuală scădere a glicemiei, şi anume:

a) *stimulează eliberarea glucozei din spaţiile lacunare*; această acţiune nu constitue însă un mecanism de reglare rapidă ca acela al stocajului lacunar; este o restituire lentă a glucozei;

b) *stimulează glicogenoliza hepatică*, ceeace duce la o deversare mai masivă a glucozei în sânge, la o creştere a glicemiei;

c) *stimulează glicogenoliza musculară*, care duce la o eliberare mai masivă de acid lactic. Acesta trece în sânge, de aici în ficat, unde e din nou transformat în glicogen hepatic, mărind astfel rezerva de glicogen, care poate fi transformat mai departe în glucoză sanguină (deci acţiune hiperglicemiantă);

d) *inhibă utilizarea glucozei în organe*, respectiv micşorează nevoia de glucide a ţesuturilor.

I. Hormonii mai importanţi cu rol în mecanismul de reglare prin acţiune hiperglicemiantă sunt:

Scanned with OKEN Scanner

α) adrenalina, hormonul secretat de medulosuprarenală, care acționează în special stimulând glicogenoliza hepatică și musculară, împiedicând pătrunderea glucozei în țesuturi, deci utilizarea ei. In felul acesta menține nivelul glicemiei. Se pare că adrenalina intervine în mecanismul de eliberare a hormonului adrenocorticotrop (ACTH) care stimulează gluconeogeneza și deci duce la o creștere a glicemiei;

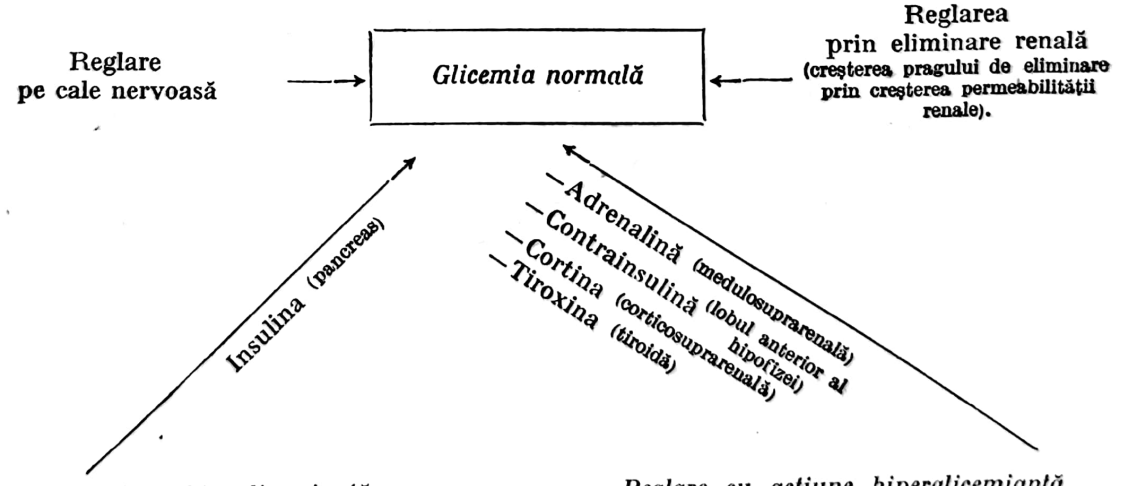
β) hormonul antefizar (secretat de lobul anterior al hipofizei) cu acțiune net antagonistă cu a insulinei, de unde și denumirea de hormon „contrainsular" sau hormon d abetogen, hormon absolut indispensabil unui metabolism glucidic normal;

γ) cortina, hormonii corticosuprarenali, produc o creștere a rezervei de glicogen hepatic. Intervin în procesele de fosforilare și deci în absorbția glucidelor din intestin, în glicogenogeneza hepatică și în pragul de resorbție al glucozei;

δ) tiroxina intervine în mecanismul de reglare cu efect hiperglicemiant prin stimularea arderilor, deci mobilizarea glicogenului hepatic, cu creșterea glucozei sanguine; produce o glicogenoliză urmată de hiperglicemie.

II. In afară de reglarea prin intervenția hormonilor, există *o reglare pe cale nervoasă prin centrii glicoreglatori*, fie printr'o acțiune directă asupra ficatului, fie printr'o acțiune indirectă asupra secreției hormonilor glicoreglatori. Leziuni ale regiunii hipotalamice ar produce glicozurii. Leziuni ale creierului, care interesează sistemele ce intervin în impulsul glicogenolitic în ficat și tractul care interesează secreția de adrenalină, pancreasul, glanda pituitară, produc turburări profunde în metabolism. Pentru creșteri mari patologice ale glicemiei există și reglarea prin eliminare renală.

Diversele mecanisme care asigură menținerea nivelului glicemiei la valoarea ei normală se pot schematiza în felul următor:



Reglare cu acțiune hipoglicemiantă

1. Activarea stocajului lacunar
2. Activarea glicogenopexiei
3. Activarea capacității de utilizare a glucozei în țesuturi.
4. Activarea transformării glucidelor în lipide
5. Inhibarea absorbției intestinale și a resorbției renale.

Reglare cu acțiune hiperglicemiantă

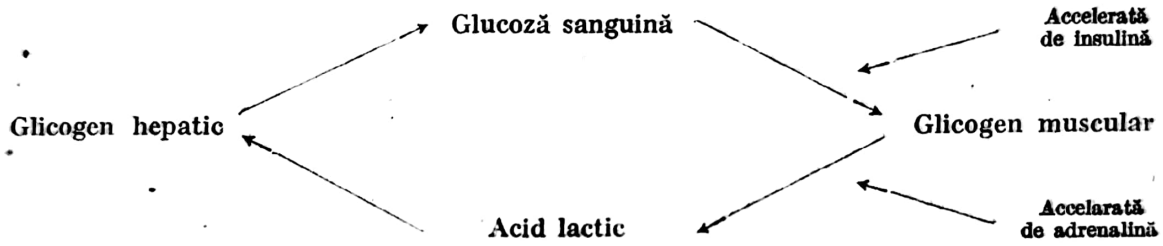
1. Activarea glicogenolizei hepatice
2. Activarea glicogenolizei musculare
3. Inhibarea utilizării glucozei în țesuturile periferice
4. Activarea absorbției intestinale și a resorbției renale.

Scanned with OKEN Scanner

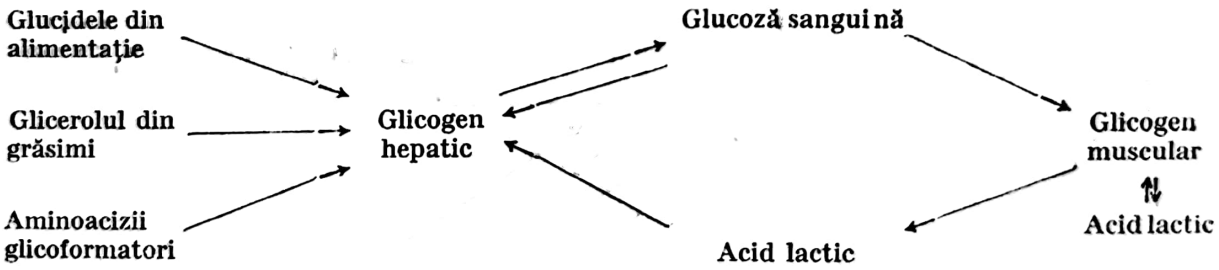
Toate acţiunile de reglare intervin prin mecanisme antagoniste declanşate de nivelul glicemiei însuşi.

Creşterea glicemiei stimulează secreţia de insulină, având ca rezultat restabilirea nivelului normal. Dacă glicemia scade, are loc o stimulare a secreţiei adrenalinice, contrainsulinice, etc., ceeace duce din nou la restabilirea valorii ei normale. Invers, dacă dintr'o cauză oarecare se produce un desechilibru hormonal, glicemia, prin variaţiile sale, tinde să restabilească acest echilibru. Hiposecreţia insulinică are acţiune hiperglicemiantă şi hiperglicemia duce la o inhibare a secreţiei adrenalinice, ceeace realizează o revenire la nivelul normal al glicemiei. Deasemenea, hiperadrenalinemia declanşează imediat hiperglicemia, care la rândul ei stimulează secreţia insulinică, corectând astfel efectul adrenalinei şi restabilind echilibrul.

Dăm mai jos schema clasică simplificată (Cori şi Cori 1929) care arată interdependenţa dintre glucoza sanguină, glicogenul hepatic, glicogenul muscular şi acidul lactic produs în glicogenoliza musculară anaerobă. Acesta e trecut pe cale sanguină din nou ficatului, unde este folosit pentru resinteza glicogenului hepatic, închizând astfel ciclul glucidelor.



O schemă mai complectă care include şi toţi precursorii posibili ai glicogenului hepatic, este următoarea:



CATABOLISMUL GLICOGENULUI IN ŢESUTUL MUSCULAR

Sursa indirectă de glucide necesare tuturor celulelor este glicogenul hepatic, iar zahărul sanguin este forma de transport prin care el este transmis celulelor celorlalte ţesuturi, calea de transport fiind calea sanguină. Celulele nu primesc deci glucidele decât sub forma zahărului sanguin, pe care îl depozitează sub forma de glicogen propriu. Acest glicogen serveşte ca sursă energetică proprie. Pătrunderea glucozei sanguine în celulă se face printr'un proces de difuziune, care este sub dependenţă neurohormonală. Problema care se pune de aci înainte este aceea a transformărilor pe care le suferă în ţesuturi acest glicogen propriu pentru a elibera

energia necesară vieţii celulare. Procesele chimice de degradare a glucidelor sunt cel mai bine cunoscute în ţesutul muscular, ţesut care este dealtfel şi cel mai mare consumator de glucide.

Degradarea glucidelor în ţesutul muscular se petrece în condiţii anaerobe şi în condiţii aerobe, care constitue respectiv *degradarea anoxibiotică şi oxibiotică a glucidelor*. Produsul final al degradării anoxibiotice este acidul lactic, produsele finale ale degradării oxibiotice sunt CO_2 şi H_2O. Eliberarea maximă a energiei acumulate în glucide are loc în degradarea aerobă.

Atât degradarea anoxibiotică, cât şi acea oxibiotică nu se petrec direct, dela produsul iniţial la cel final, ci printr'un şir de reacţii intermediare care eliberează treptat şi pe măsura nevoilor ei energia necesară vieţii celulare.

Metodele de studiu al glicogenolizei sunt cele ale metabolismelor în general, rezultatele ultime cele mai preţioase fiind date de metoda izotopilor.

Studiul acestui metabolism este legat de numele lui Meyerhof, Parnas, Szent-Györgyi, Krebs, etc.

Vom expune mai întâi rezultatele studiului glicogenolizei musculare anoxibiotice.

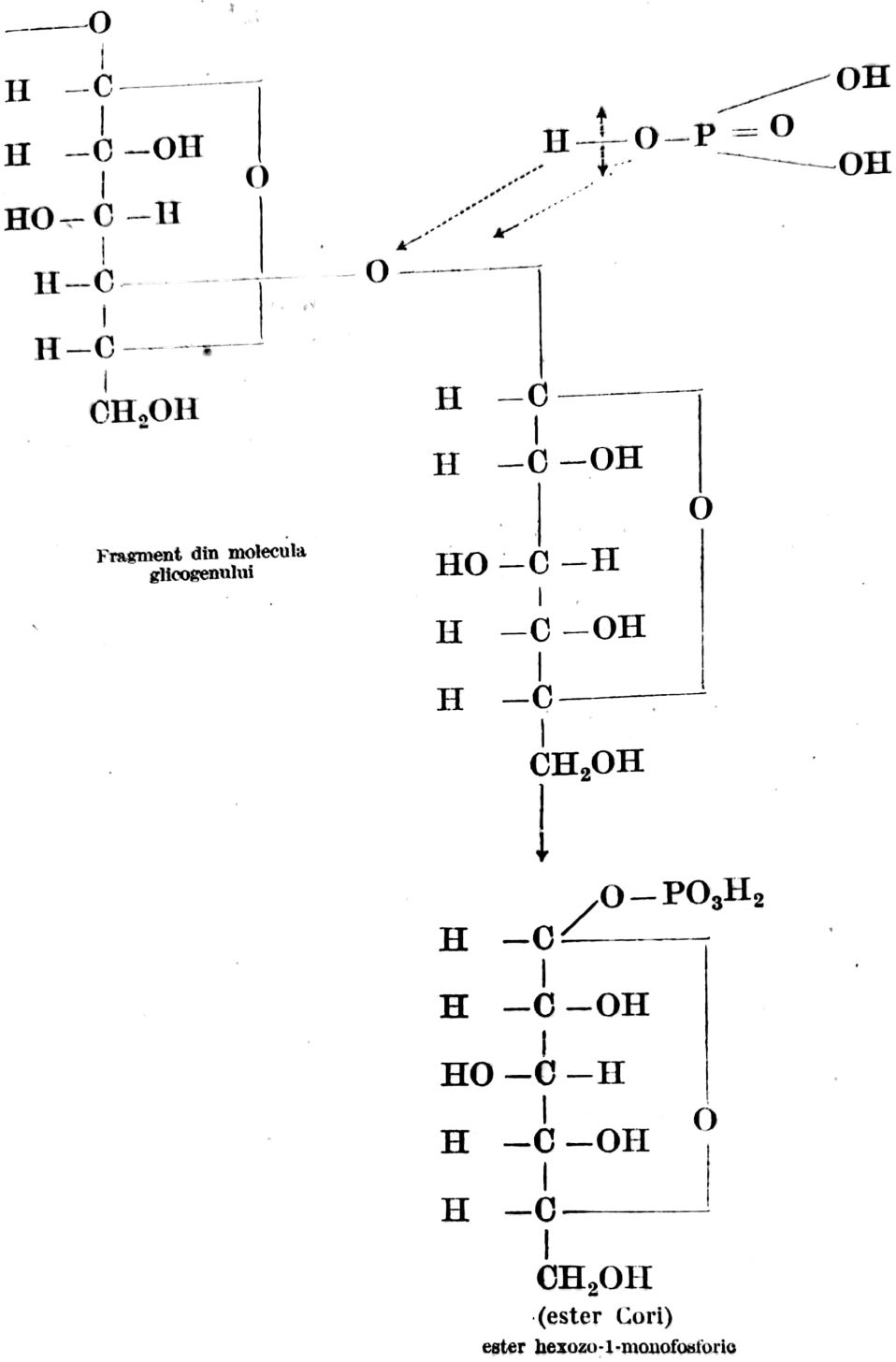
Catabolismul anoxibiotic al glucidelor

Etapele glicogenolizei musculare anaerobe sunt pe scurt următoarele :

1. fosforoliza glicogenului cu scindare în esteri hexozofosforici ;
2. transfosforilarea esterilor hexozofosforici ;
3. fosforilarea esterilor hexozomonofosforici în esteri hexozodifosforici ;
4. scindarea esterului hexozodifosforic în esteri triozomonofosforici ;
5. oxidarea esterilor triozomonofosforici în acid fosfogliceric ;
6. transformarea acidului fosfogliceric în acid piruvic ;
7. transformarea acidului piruvic în acid lactic.

Fiecare din aceste etape chimice este catalizată de un sistem enzimatic specific fiecăreia şi necesită, în acelaş timp, prezenţa unor sisteme chimice foarte importante, ca de exemplu acizii adenilici : acidul adenozintrifosforic (ATF), acidul adenozindifosforic (ADF), acidul adenilic (AA), sistemul creatină-fosfocreatină, sisteme care funcţionează ca donatori şi acceptori de grupare fosforică, precum şi prezenţa indispensabilă a unor ioni, ca ionul de Mg^{++}, Mn^{++}, Co^{++}. Vom descrie fiecare etapă în parte.

1. **Fosforoliza glicogenului.** Glicogenul este componenta iniţială dela care porneşte procesul de degradare a glucidelor în ţesutul muscular ; este un polimer al glucozei, radicalii moleculelor de glucoză fiind piranoze legate glicozidic, C_1 al unui radical fiind legat de C_4 al radicalului vecin.



Fragment din molecula glicogenului

(ester Cori)

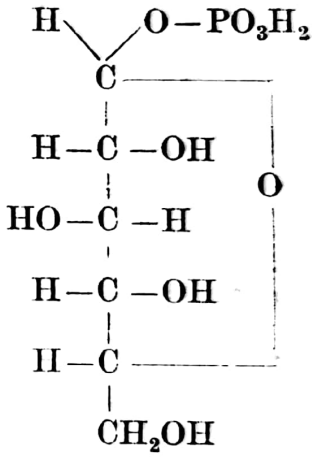
ester hexozo-1-monofosforic

Fosforoliza glicogenului este primul stadiu al degradării aerobe a glucidelor.

Primul atac al glicogenului se face printr'o depolimerizare a moleculei mari, în moleculele mici componente. Depolimerizarea nu se face, însă, printr'un proces hidrolitic cu ajutorul componentelor apei, ci prin intervenția componentelor acidului ortofosforic PO_4H_3, și anume $PO_4H_2^-$ și H^+. Parnas a arătat, că, dacă se adaugă glicogen unui extract muscular, degradarea glicogenului nu are loc decât în prezența fosfaților. Lucrând cu ^{32}P radioactiv, încorporat moleculei de fosfat monosodic $^{32}PO_4H_2Na$

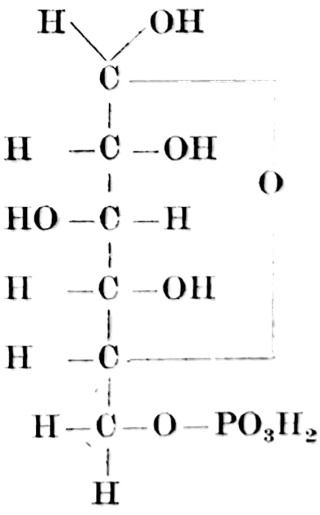
adăugată sistemului, se constată apariţia în acest sistem a unui ester hexozomonofosforic, conţinând ^{32}P radioactiv. El explică acest proces în felul următor: acidul ortofosforic $HO-P(=O)(OH)_2$ lucrează printr'un mecanism analog cu al moleculei de H_2O, scindând printr'un proces asemănător celui hidrolitic molecula mare, polimerizată puternic a glicogenului, în moleculele componente mai mici, şi fixând la punctele de scindare componentele disociate ale acestui acid: H^+ şi $O^- - P(=O)(OH)$ (în loc de ionii H^+ şi OH^- din molecula apei, ca în cazul scindării hidrolitice).

Gruparea $^-O-P(=O)(OH)$ se fixează la C_1 al uneia din moleculele glucopiranozice, iar H^+ la C_4 al moleculei vecine. Prin analogie cu procesul de hidroliză, Parnas numeşte acest proces de scindare a legăturii glicozidice cu fixarea radicalului fosforic, fosforoliză. Această reacţie este catalizată de o enzimă specifică, *de o fosforilază*. S'a reuşit izolarea a două fosforilaze, *a* şi *b*, după cum muşchiul este în stare de repaus sau în activitate. Primul compus, rezultat din fosforoliza glicogenului, este esterul glucozo-1-monofosforic descoperit de Cori şi numit, deaceea şi esterul Cori:


ester Cori
ester hexozo-1-monofosforic

Acest proces de fosforoliză necesită prezenţa fosfatului anorganic. E de observat că fosforilarea directă a glucozei e catalizată de către o hexokinază.

2. **Transfosforilarea hexozelor** este etapa imediat următoare. Esterul Cori este un ester glucopiranozo-1-monofosforic (vezi formulele); acesta, sub acţiunea catalitică a unei enzime, fosfoglucomutaza, este transformat în ester glucozo-6-monofosforic sau ester Robison:

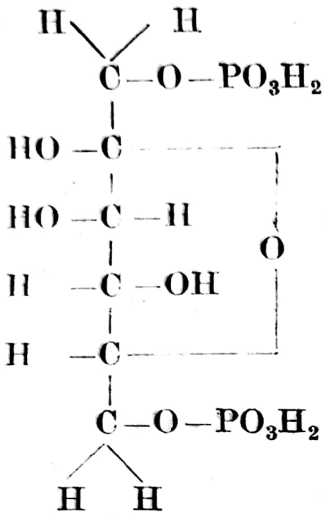

ester Robison
ester hexozo-6-monofosforic

Deci, printr'un proces de transfosforilare intramoleculară are loc un transport al radicalului fosforic dela C_1 la C_6. S'a putut urmări transportul grupării fosfat cu ajutorul ^{32}P radioactiv. Reacţia necesită prezenţa ionilor de Mg^{++}, Mn^{++} sau Ca^{++}.

3. **Izomerizarea hexozelor** este a treia etapă. Esterul Robison (gluco piranozo-6-fosfat), sub acţiunea unei izomeraze, fosfohexozoizomeraza, este transformat în izomerul său, esterul fructofuranozo-6-fosfat, sau esterul Neuberg. Aceşti

doi izomeri se găsesc într'un amestec în echilibru, cunoscut înainte sub numele de ester Embden sau lactacidogen.

4. **Fosforilarea esterului hexozomonofosforic.** Esterul Neuberg suferă o nouă fosforilare cu fixarea unei noi grupări fosforice la C_1 şi formare de ester fructofuranozo-1,6-difosfat sau esterul Harden-Young.

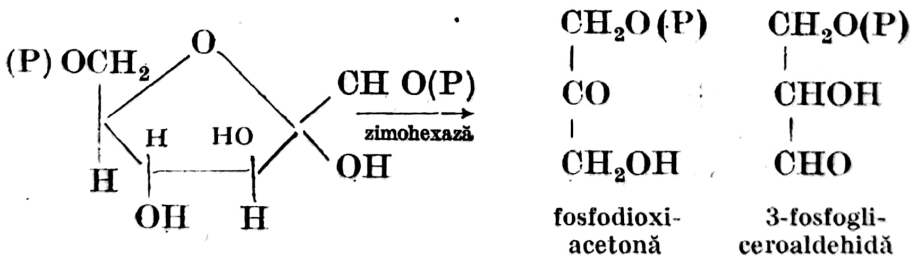


ester Harden-Young
ester fructozo-1, -6-difosfat

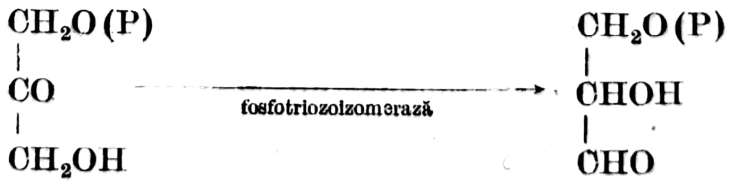
Radicalul fosforic, necesar acestei de a doua fosforilări, nu poate fi cedat de orice produs fosfatat, ca de exemplu fosfaţii minerali, cum se întâmplă în cazul fosforolizei glicogenului, ci necesită, după cum a arătat Parnas, prezenţa unui anume compus fosforat şi anume, prezenţa acidului adenozintrifosforic (ATF). Lucrând cu ATF care conţine ^{32}P în moleculă, se regăseşte ^{32}P în molecula esterului Harden-Young, de unde rezultă că a avut loc un transfer de fosfat dela adenozintrifosfat la hexozomono-fosfat, conform reacţiei: *ATF + fructozo — 6-fosfat → ADF + fructozo-1,6-difosfat* cu formarea deci de ester hexozodifosforic şi acid adenozin-difosforic (ADF).

Reacţia e catalizată de o fosfohexokinază şi necesită prezenţa ionilor de Mg^{++}. Eliberarea mare de energie datorită desfacerii legăturii puternic energetice ~ P din molecula ATF este folosită în reacţia puternic endergonică de formare a difosfatului. Esterul fructozo-1,6-difosfat (Harden-Young) este ultimul produs de degradare a glicogenului care mai conţine 6 atomi de carbon. Dela acest compus, la care s'a ajuns prin fosforoliză, transfosforilare şi fosforilare, se ajunge la produse de scindare cu 3 atomi de carbon în moleculă. A cincia etapă este astfel:

5. **Transformarea hexozodifosfatului în triozofosfaţi:**



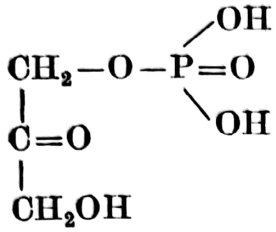
Transformarea fructozodifosfatului în triozofosfaţi



Transformarea fosfodioxiacetonei în fosfogliceroaldehidă

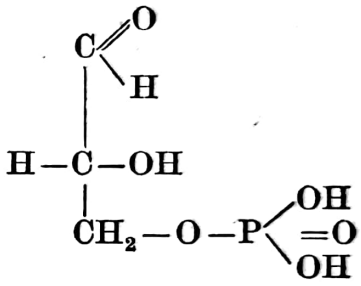
(P) reprezintă radicalul fosforic PO_3H_3

Esterul hexozo-1, 6-difosfat (Harden-Young) este scindat sub acțiunea catalitică a unei aldolaze (zimohexaza) în două molecule de fosfotrioze, și anume în aldehidă 3-fosfoglicerică și dioxiacetonfosfat (fig. 102).



acid dioxiacetonfosforic

Această reacție are loc și în extractele musculare. Intre aceste două componente există un echilibru, și anume, 3% se găsesc sub formă de aldehidă 3-fosfoglicerică, restul ca dioxiacetonfosfat. Aceste două trioze se pot considera ca esteri ai zaharurilor cu 3 atomi de carbon și ca formele reacționabile ale zaharurilor. Produsele intermediare au fost puse în evidență prin oprirea la acest stadiu a reacțiilor cu ajutorul acidului mono- iodacetic, toxic al enzimelor care le catalizează. Deoarece forma mai reactivă dintre aceste două trioze este fosfogliceroaldehida, în celule are loc sub acțiunea unei enzime, o izomerază: fosfotriozoizomeraza, o transformare a fosfodioxiacetonei în fosfogliceroaldehidă (vezi formulele). Dela această componentă pornesc de fapt toate transformările ulterioare. Etapele de până acum, în afară de aceea a fosforilării fructozo-6-fosfatului de către ATF, se petrec fără modificări energetice importante. Etapa următoare, aceea a oxidării acestei trioze și cele următoare, se petrec însă cu modificări energetice importante.



aldehida-3-fosfoglicerică

6. **Oxidoreducerea triozofosfatului.** Forma biologic activă a aldehidei fosfoglicerice este forma *d* : *D* — aldehid -3-fosfoglicerică :

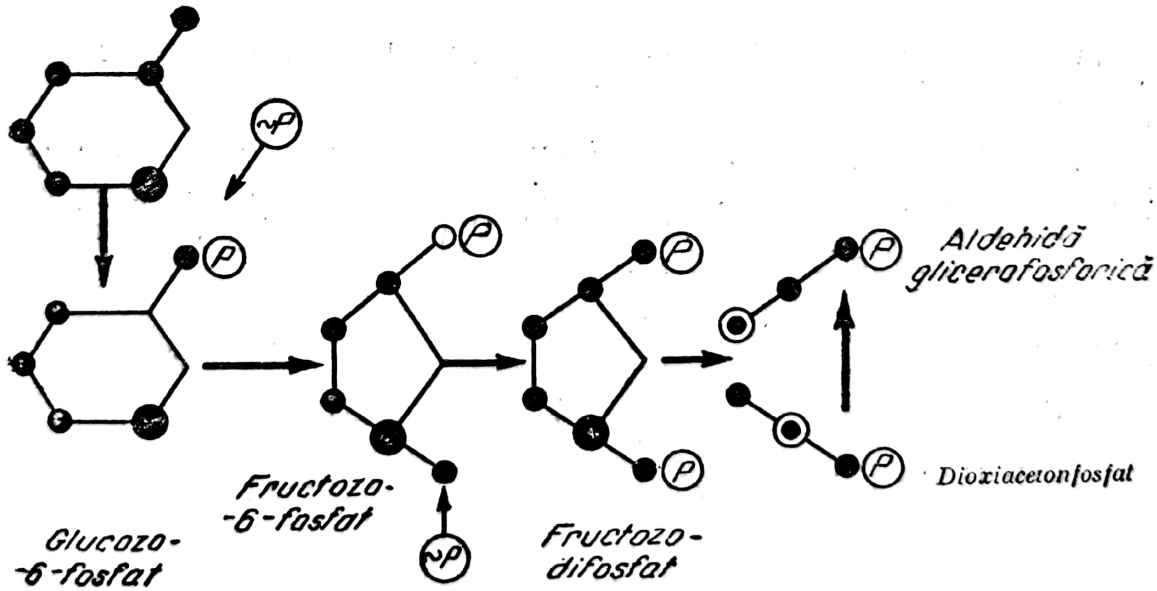
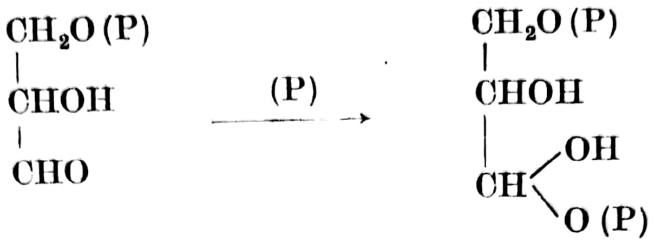


Fig. 102. Degradarea anaerobă a glucozei în triozofosfat

(P) = legătură puternic energetică)

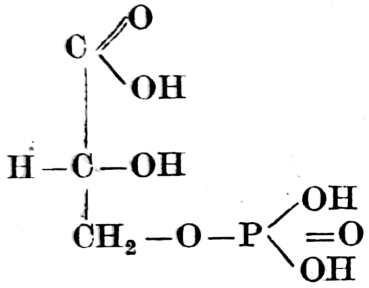
Scanned with OKEN Scanner

Acest compus este fosforilat şi transformat în difosfo-1,3-gliceroaldehidă în prezenţa fosfaţilor minerali liberi; procesul ar fi neenzimatic: 3-fosfogliceroaldehidă + PO_4H_3 ⇄ 1,3-difosfogliceroaldehidă.



3-fosfogliceroaldehidă — 1, 3-difosfogliceroaldehidă

Aldehida 1,3-difosfoglicerică este transformată ulterior, printr'un proces de oxidoreducere de tip Cannizzaro, în acid difosfo-1,3-gliceric, în prezenţa coenzimei I (difosfopiridinnucleotid DFN) şi a unei fosfogliceroaldehiddehidrogenaze: 1,3-difosfogliceroaldehida + DFN (CO_1) ⇄ ⇄ 1,3-acid difosfogliceric + DFN.H_2. Acest produs este transformat în acid 3-fosfogliceric:



acid 3-fosfogliceric

(sau esterul Nielsen), în prezenţa unei fosforilaze specifice, difosfoglicerindefosforilaza, a coenzimei I şi a acidului adenozindifosforic (ADF) ca acceptor de grupare fosfat: acid 1,3-difosfogliceric + ADF ⇄ acid 3-fosfogliceric + ATF. Au loc aşa dar următoarele reacţii:

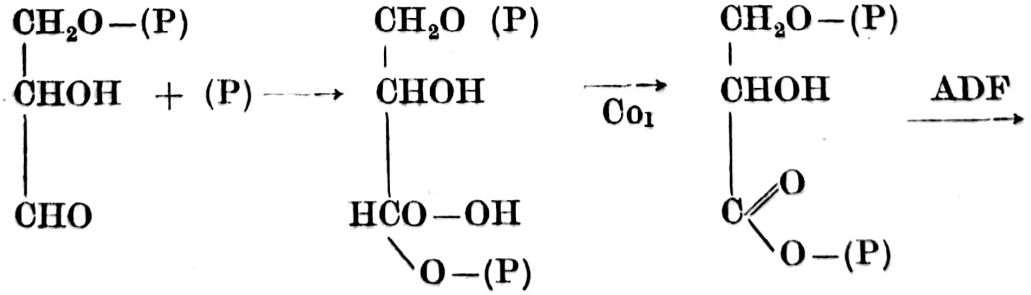
a) aldehida-3-fosfoglicerică + fosfat anorganic → aldehida 1,3-difosfoglicerică;

b) aldehida 1,3-difosfoglicerică + DFN → acidul 1,3-difosfogliceric + DFN.H_2. In această reacţie, reducerea difosfopiridinnucleotidei este însoţită de eliberare de energie, care este absorbită în reacţia următoare de transfer a grupării fosfat pe ADF;

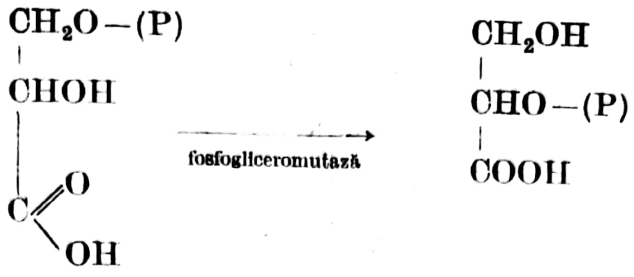
c) acidul 1,3-difosfogliceric + ADF → acidul 3-fosfogliceric + ATF. Această ultimă reacţie este extrem de importantă deoarece reface ATF necesar fosforilării hexozelor.

7. Transformarea acidului fosfo-3-gliceric în acid fosfo-2-gliceric. Acidul 3-fosfogliceric e transformat în acid 2-fosfogliceric prin transportul intramolecular al grupării fosfat dela C_3 la C_2 (vezi formulele), sub acţiunea unei mutaze, fosfogliceromutaza.

acid 3-fosfogliceric ⟵ fosfogliceromutaza ⟶ acid 2-fosfogliceric:



aldehidă 3-fosfoglicerică — aldehidă 1, 3-difosfoglicerică — acid 1, 3-difosfogliceric



acid 3-fosfogliceric — acid 2-fosfogliceric

8. **Trecerea acidului 2-fosfogliceric**, sub acţiunea unei enolaze, *în acid 2-fosfoenolpiruvic.*

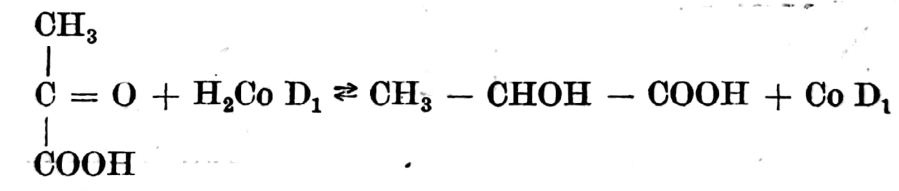
acid 2-fosfogliceric $\underset{+H_2O}{\overset{-H_2O}{\rightleftharpoons}}$ acid 2-fosfoenolpiruvic.

9. **Acidul 2-fosfoenolpiruvic este transformat în acid piruvic** (forma enolică) în prezenţa acidului adenozindifosforic (ADF) sau a acidului adenilic (AA) şi sub acţiunea *catalitică a unei transfosforilaze.* Reacţia este inhibată de FNa, necesită prezenţa sistemului ADF sau AA (acid adenilic) şi a ionilor de Mg şi posibil a ionilor de K, acizii adenilici fiind acceptorii specifici ai radicalului fosfat scindat de pe molecula acidului fosfopiruvic.

acid fosfoenol piruvic + ADF → acid piruvic + ATF.

Defosforilarea acidului fosfoenolpiruvic eliberează 10 000 — 12 000 calorii/mol fosfat. Nu este reversibilă în condiţii de anaerobioză.

10. **Transformarea acidului piruvic în acid lactic** în condiţii de anaerobioză, în ţesutul muscular. Această reacţie are loc în prezenţa coenzimei I reduse DFN $.H_2$ şi a lacticodehidrogenazei, conform reacţiei : acid piruvic + + DFN $.H_2 \rightleftarrows$ acid lactic + DFN :



acid piruvic — acid lactic

O schemă a tuturor etapelor de degradare este dată alăturat. Vom reveni asupra acestei scheme cu complectările necesare la capitolul „Chimismul contracţiei musculare".

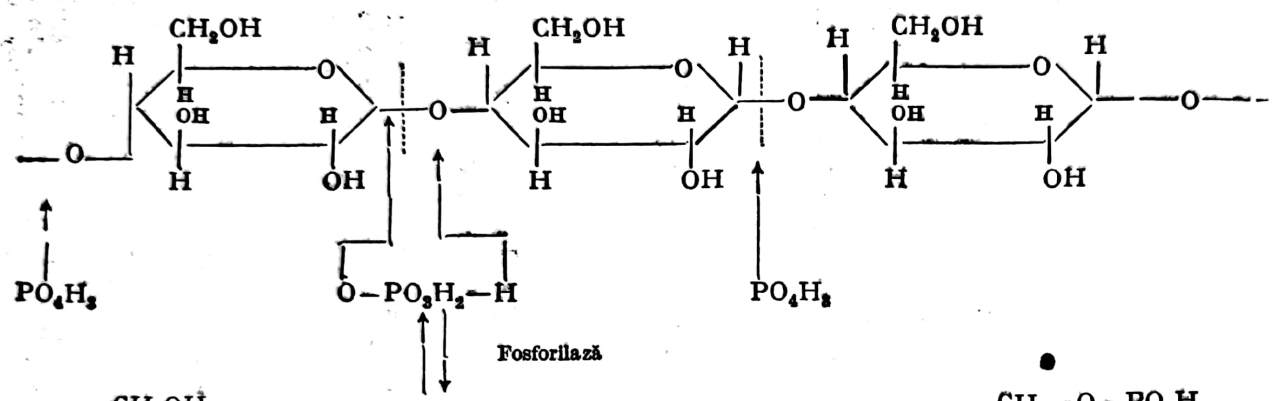
In drojdia de bere, degradarea glucidelor se face după aceeaşi schemă ca în ţesutul muscular, numai că în ultima etapă, pornind dela acidul piruvic, calea de degradare este diferită, şi anume acidul piruvic este *decarboxilat* sub acţiunea decarboxilazei pentru a forma *acetilaldehidă* şi CO_2, conform reacţiei

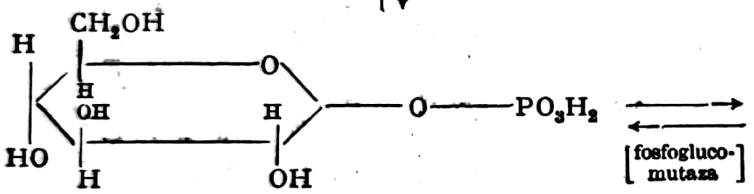
$$CH_3-CO-COOH \rightarrow CH_3-CHO+CO_2$$

Acetilaldehida poate fi apoi redusă la alcool etilic de către dihidrocodehidraza I.

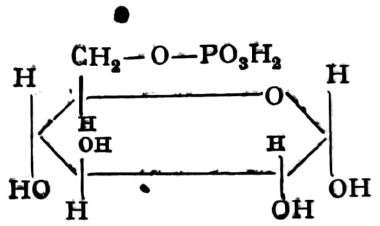
Etapele descrise mai sus decurg în ţesutul muscular (respectiv drojdia de bere) în absenţa oxigenului molecular, în condiţii de anaerobioză şi se înglobează în prima mare etapă a degradării glucidelor, cea de a doua etapă fiind degradarea în condiţii *oxibiotice*, deci în prezenţa oxigenului molecular. In absenţa lui, acidul piruvic este redus în acid lactic de către codehidraza redusă ($DFNH_2$) în prezenţa acid lacticdehidrogenazei, code-

Fazele de degradare anaerobă a glicogenului în țesutul muscular

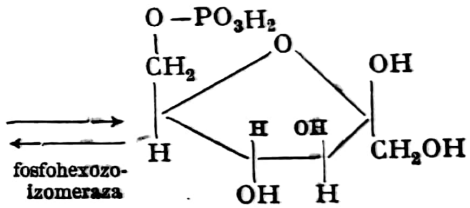




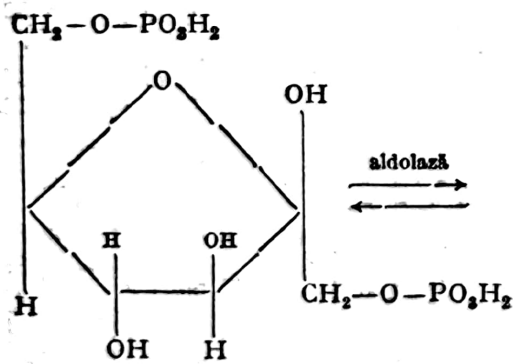
(1⁰) Glucozo-1- fosfat



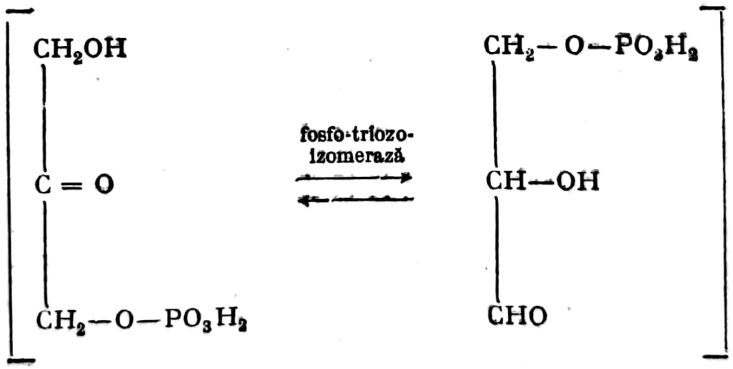
(2⁰) Glucozo-6-fosfat



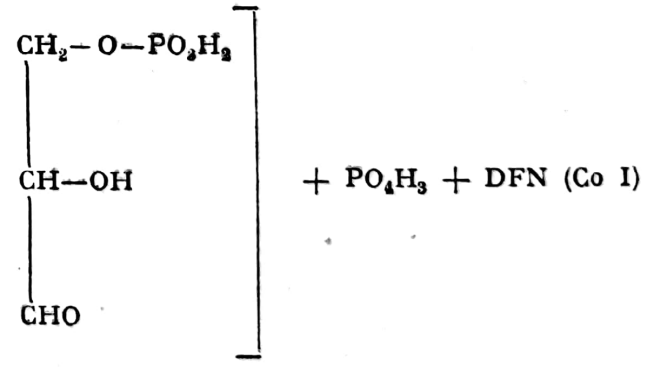
(3⁰) Fructozo-6-fosfat



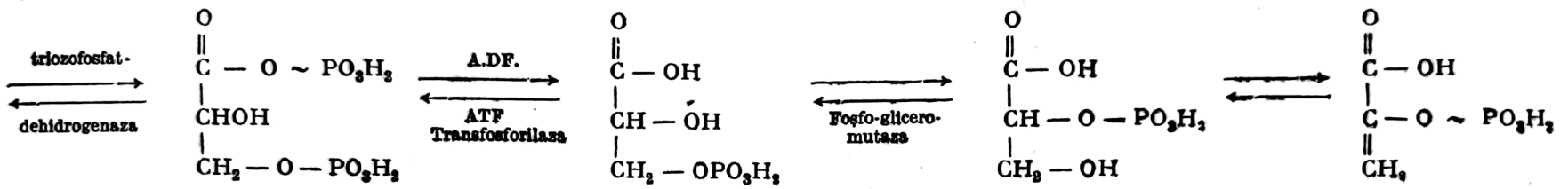
Fr uctozo-1-6-difosfat



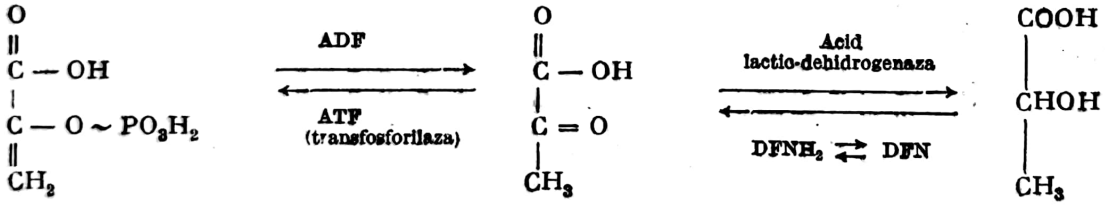
(4⁰) Dihidroxiaceton-fosfat



3—fosfoglicero—aldehida



(5⁰) 1-3-Acid difosfogliceric (6⁰) Acid-3-fosfogliceric (7⁰) Acid-2-fosfogliceric (8⁰) Acid-2-fosfo-enol-piruvic



(9⁰) Acid piruvic (10⁰) Acid lactic

hidraza fiind regenerată în forma oxidată. In condiţii aerobe, coenzima redusă nu este regenerată de către acidul piruvic prin trecerea lui în acid lactic, ci de către oxigenul molecular prin intermediul combinat al sistemelor oxidoreductoare (fermenţi galbeni, citocromi, sistemul diacizilor tetracarbonici, citocromoxidaza), care intervin astfel încât acidul lactic nu se mai formează. Din cantitatea formată totuşi în condiţii anaerobe, o cincime este oxidată tot pe calea acidului piruvic până la CO_2 printr'o serie de etape pe care le vom descrie şi care constitue un alt ciclu de reacţii, aşa numitul ciclu al acizilor tricarboxilici. In procesul de degradare a glucidelor în ţesutul muscular, care are loc în faza anaerobă, procesele de fosforilare au o importanţă fundamentală şi vom vedea la capitolul chimismului contracţiei musculare că formarea acidului lactic în această fază, necesitând producerea de acid adenozintrifosforic (ATF), este extrem de importantă, deoarece muşchiul utilizează energia eliberată din legăturile puternic energetice ale moleculei de ATF pentru realizarea travaliului său.

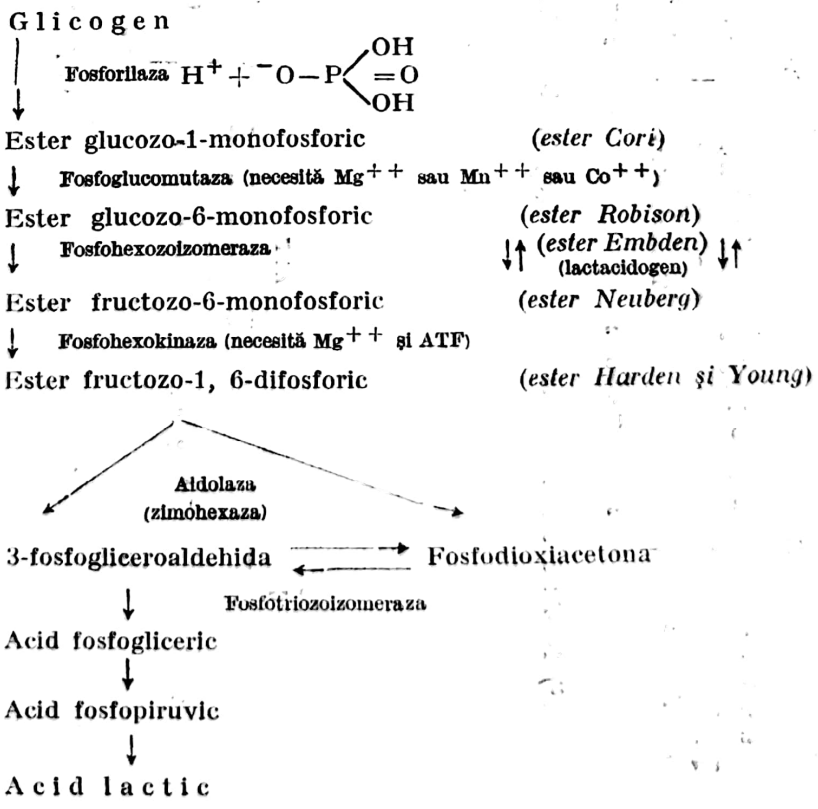
Reacţia însumată care conduce la transformarea unui mol glucoză din glicogen este astfel:

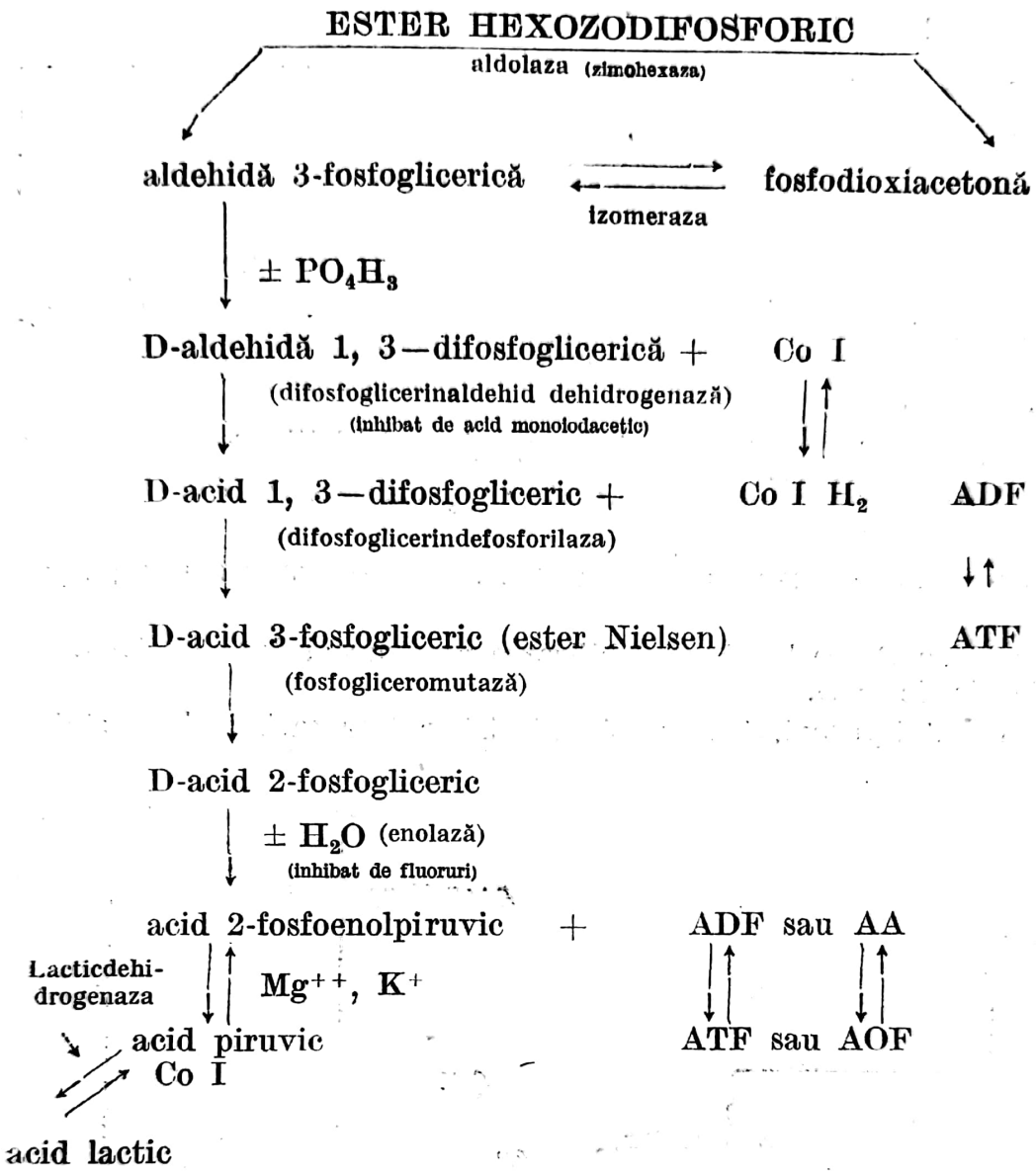
glucoză (din glicogen) + ~ (P) + 3 PO_4H_3 → 2 acid lactic + 4 ~ (P) + + 40 000 calorii.

Dacă glucoza trebue să fie fosforilată în glucozo-6-fosfat mai este necesară o legătură puternic energetică din ATF, ceeace reduce energia eliberată la 30 000 calorii (vom reveni cu detalii asupra acestui lucru la capitolul „Chimismul contracţiei musculare").

Toate reacţiile din ciclul anaerob, cu excepţia defosforilării acidului piruvic, sunt reversibile. Cu excepţia a două reacţii, toate sunt catalizate de enzime specifice, unele necesitând prezenţa coenzimelor I sau II sau a fermentului galben.

Schema produselor intermediare care apar în cursul glicogenolizei musculare anaerobe





Etapele degradării anaerobe a glucidelor în țesutul muscular cuprinse între formarea esterului hexozodifosforic și a acidului lactic.

Tabelul 21

Schema rezumativă a reacțiilor de glicoliză

Reacția	Enzima	Coenzima	Inhibitori	Reacția	Enzima	Coenzima	Inhibitori
1	Fosforilază	$-PO_3H_2$	Dializa	8	Triozofosfatdehidrogenază. . .	Co I	Dializa, CH_3I COOH
2	Fosfoglucomutază .	,,	,,	9	Fosfokinază . . .	ADF	Dializa
3	Oxoizomerază . . .	,,	,,	10	Fosfogliceromutază	,,	,,
4	Fosfohexokinază . .	ATF	,,	11	Enolază	Mg++	NaF
5	Zimohexază	,,	,,	12	O-fosfokinază. . .	ADF	Dializa
6	Fosfotriozoizomerază	,,	,,	13	Spontană.	,,	,,
7	Spontană ?.	$-PO_3H_2$	,,	14	Lacticdehidrogenază	Co I	,,

Catabolismul oxibiotic al glucidelor

Degradarea oxibiotică a glucidelor se face cu participarea oxigenului molecular, spre deosebire de degradarea anoxibiotică, care se face în absența acestuia. Produsele finale ale degradării aerobe sunt CO_2 și H_2O. Oxigenul molecular nu se unește însă direct cu hidrogenul substratului, ci printr'un șir de reacții intermediare (fig. 103). Prin acest mecanism se realizează treptat o labilizare a hidrogenului substratului, proces în care intervin dehidrogenazele, fermenții galbeni, sistemul diacizilor tetracarbonici, etc. Paralel are loc și o labilizare a oxigenului molecular, labilizare în care intervine sistemul citocrom-citocromoxidază.

$SH_2 + A \rightarrow S + AH_2$

$AH_2 + B \rightarrow A + BH_2$ unde S este substratul, A+B acceptori intermediari de hidrogen.

$BH_2 + 2$ citocrom-$Fe^{+++} \rightarrow B + 2$ citocrom-$Fe^{++} + 2H^+$

2 citocrom-Fe^{++} + 2 citocromoxidază $Fe^{+++} \rightarrow$ 2 citocrom Fe^{++}

+2 citocrom oxidază Fe^{++}

2 Citocromoxidază $Fe^{++} + \frac{1}{2} O_2 + 2\,H^+ \rightarrow$ 2 citocromoxidază $Fe^{+++} + H_2O$.

Unirea H cu O are loc după labilizarea acestora și duce la formarea unei molecule de H_2O.

După Szent-Györgyi, intervenția diacizilor tetracarbonici ar stabili

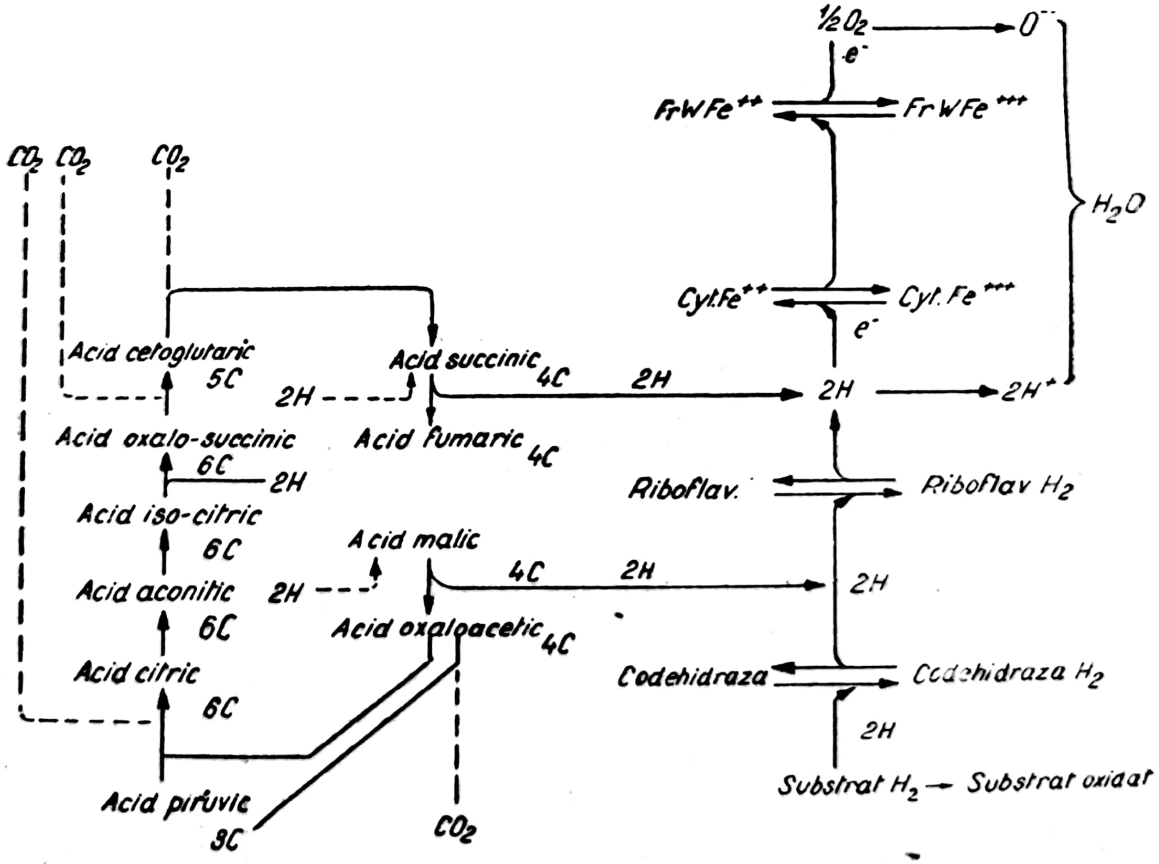
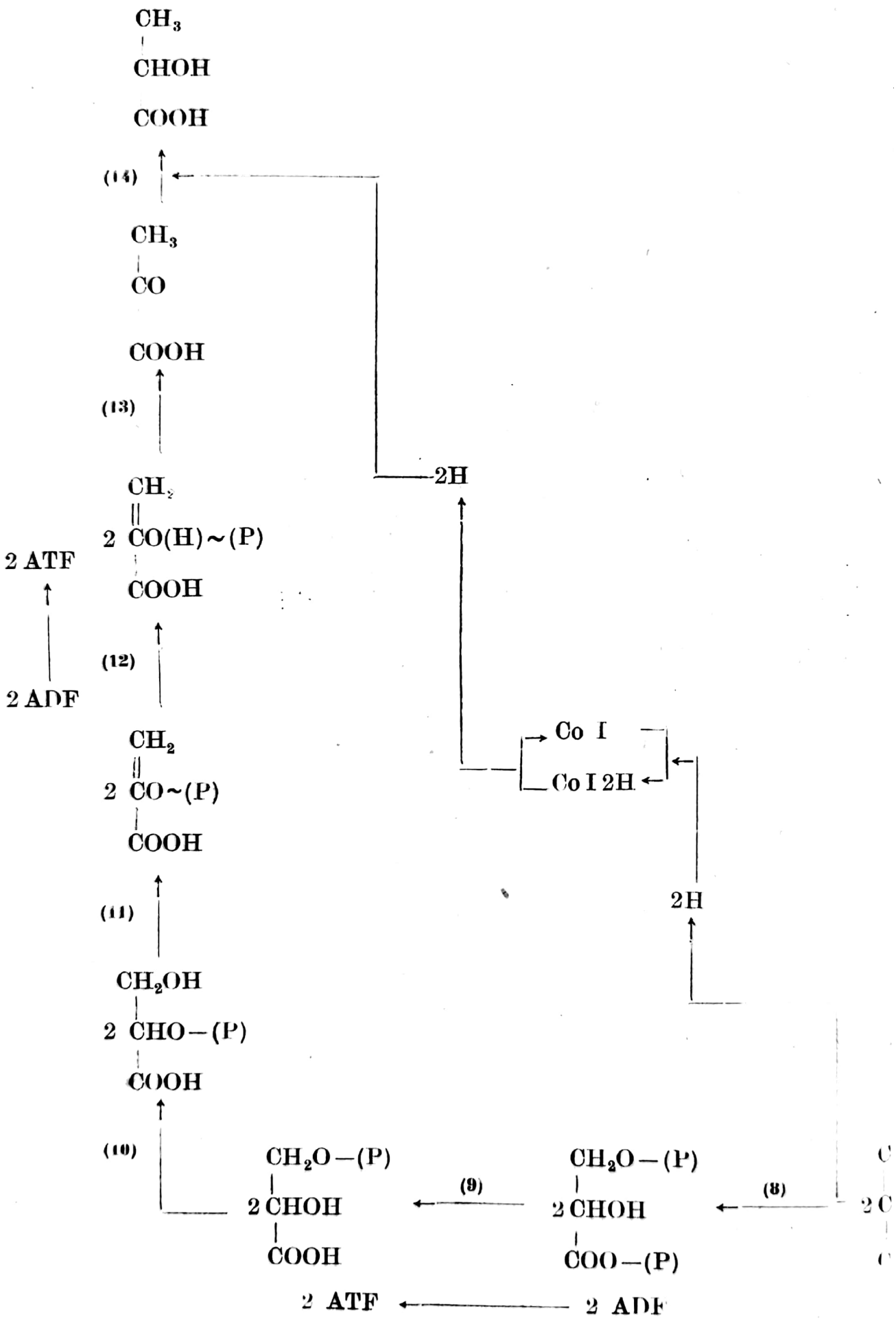
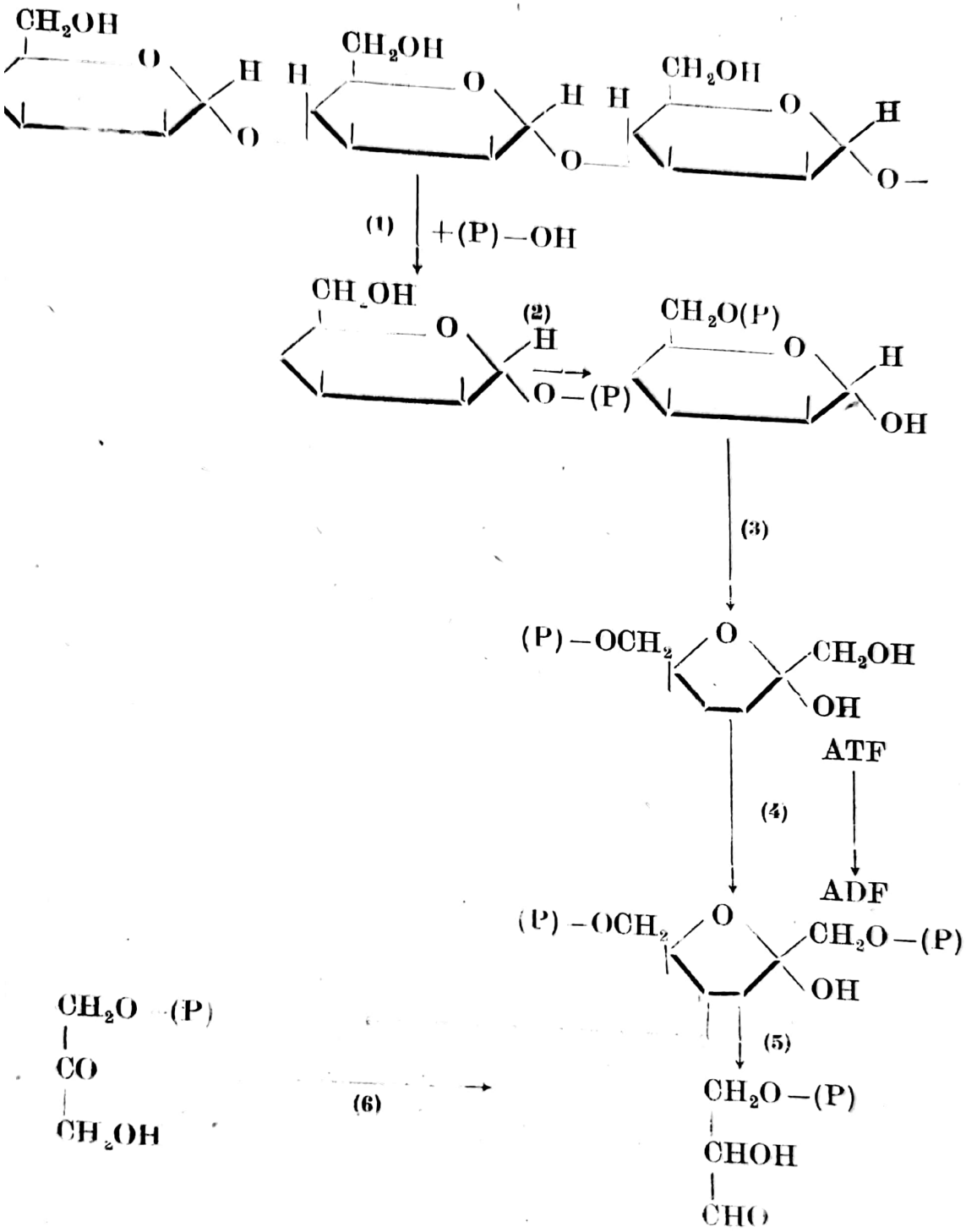


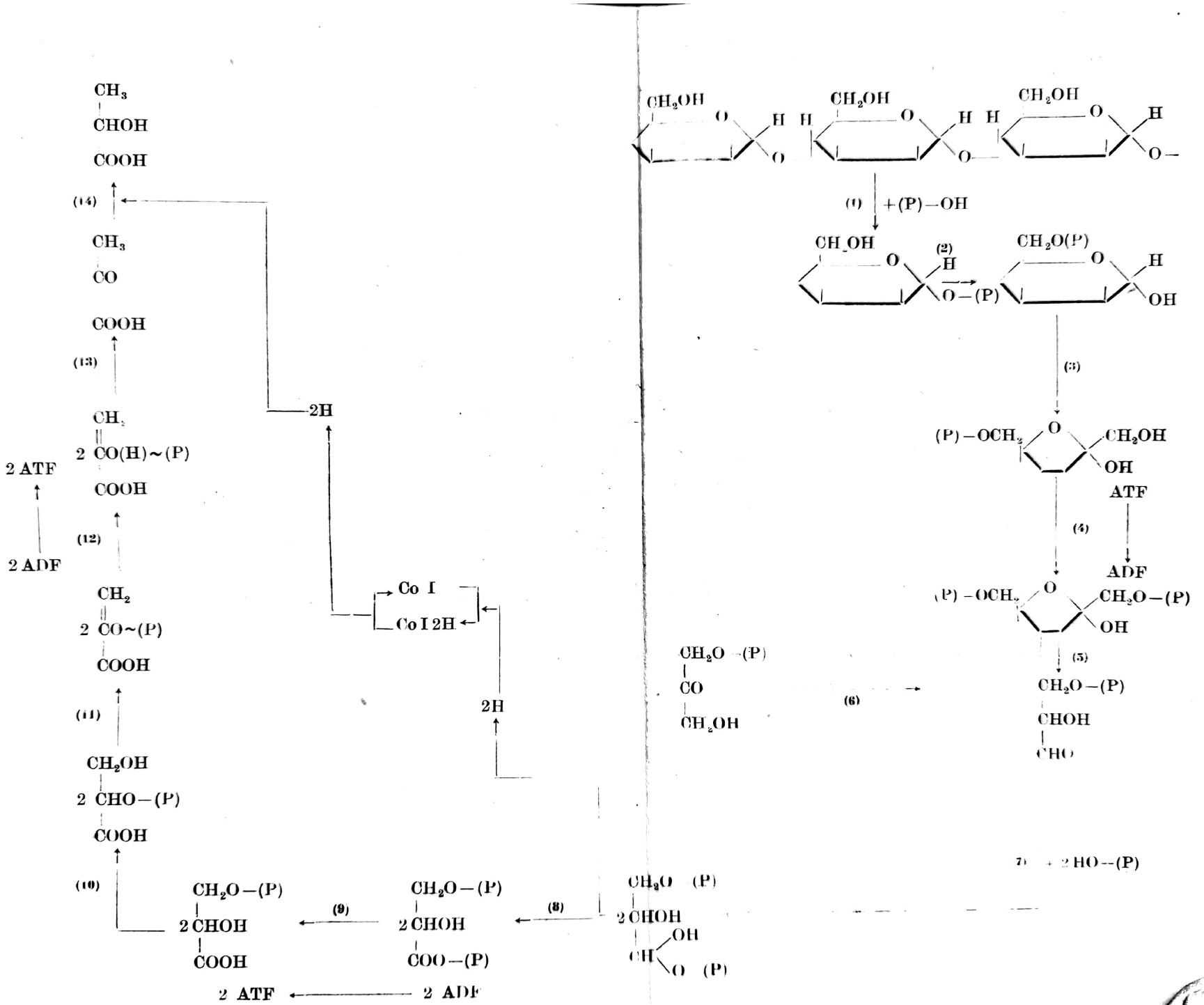
Fig. 103. *Degradarea aerobă a glucidelor - Intervenția enzimelor de oxido-reducere*



Schema degradării

Scanned with OKEN Scanner

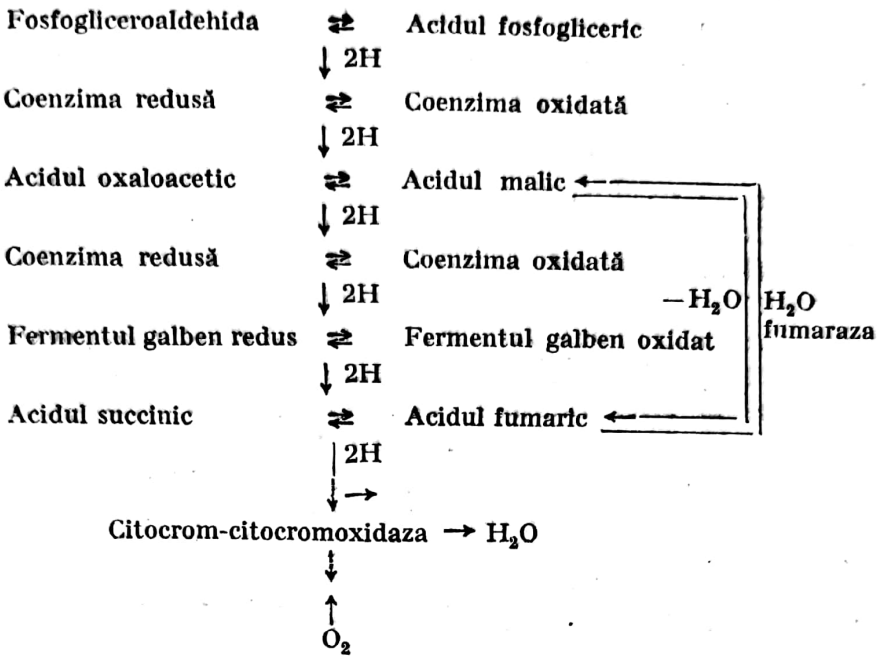

(1)
+(P)—OH
(2)
(3)
(4)
ATF
ADF
(5)
(6)
(7)
+ 2 HO—(P)



Schema degradării glucidelor

Scanned with OKEN Scanner

un lanţ de reacţii în care intervin coenzima I, fermentul galben şi sistemul citocromic, conform schemei :



Oxidarea triozei cu ajutorul ciclului diacizilor tetracarbonici

Sistemul diacizilor tetracarbonici este termodinamic posibil. Considerarea valorilor potenţialului de oxidoreducere al sistemelor implicate în acest proces indică acest lucru (vezi tabelul 22).

Tabelul 22

	Potenţial de oxidoreducere în volţi	Condiţii experimentale
Coenzima I+Coenzima I redusă	−0,282	pH=7 T=30°
Malatdehidrogenaza-oxaloacetat	−0,102	pH=7 T=38°
Succinatdehidrogenaza-fumarat	+0,015	pH=6 T=30°
Citocrom C-citocrom C redus	+0,262	pH=5,8 T=30°

Deci, coenzima I poate reduce oxaloacetatul, malatul, fumaratul, succinatul, citocromul C.

Szent-Györgyi presupune că dehidrogenaza succinică, malică şi citocromoxidaza ar fi strâns legate de granulele musculare care se găsesc în suspensie în preparatele cu care se lucrează.

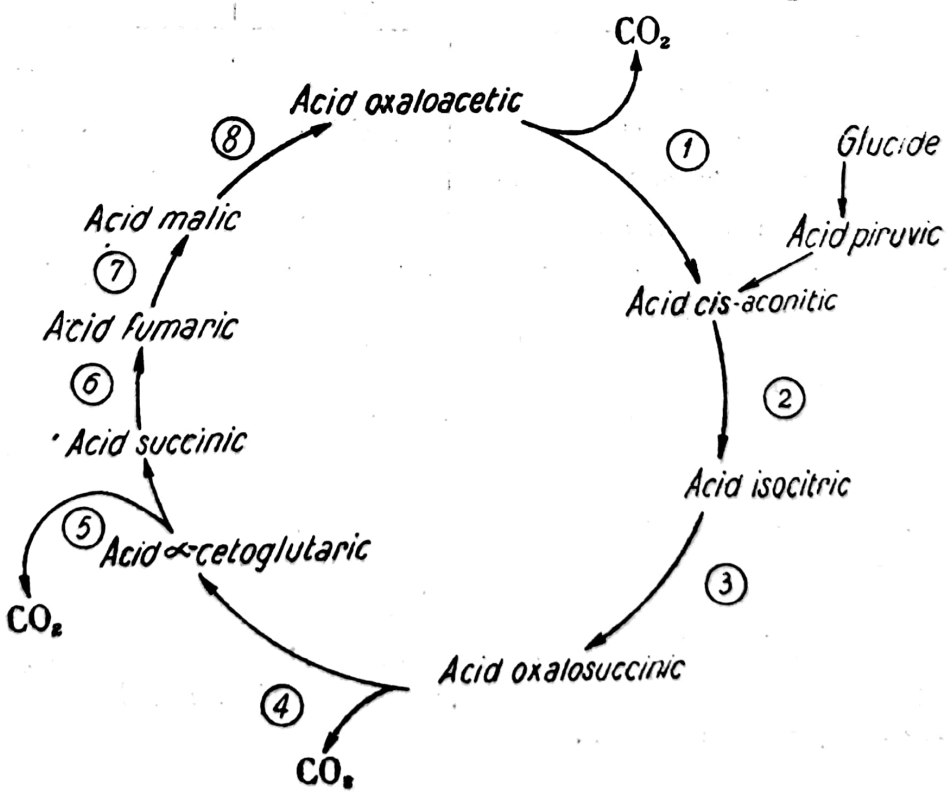
A doua componentă rezultată din degradarea oxidativă, CO_2, se formează printr'o decarboxilare a acizilor carboxilici rezultaţi în cursul acestei degradări, decarboxilare care are loc sub acţiunea catalitică a enzimei carboxilaza. Nu se ştie cu precizie dacă oxibioza, adică degradarea aerobă a glucidelor, se face direct dela hexoze (respectiv glicogen) sau dela produsul final al degradării anaerobe, acidul lactic sau, mai exact, predecesorul său, acidul piruvic; ambele mecanisme sunt posibile, deşi se admite în mod obişnuit că *anoxibioza este cantitativ stadiul preparativ cel mai important pentru oxibioză.*

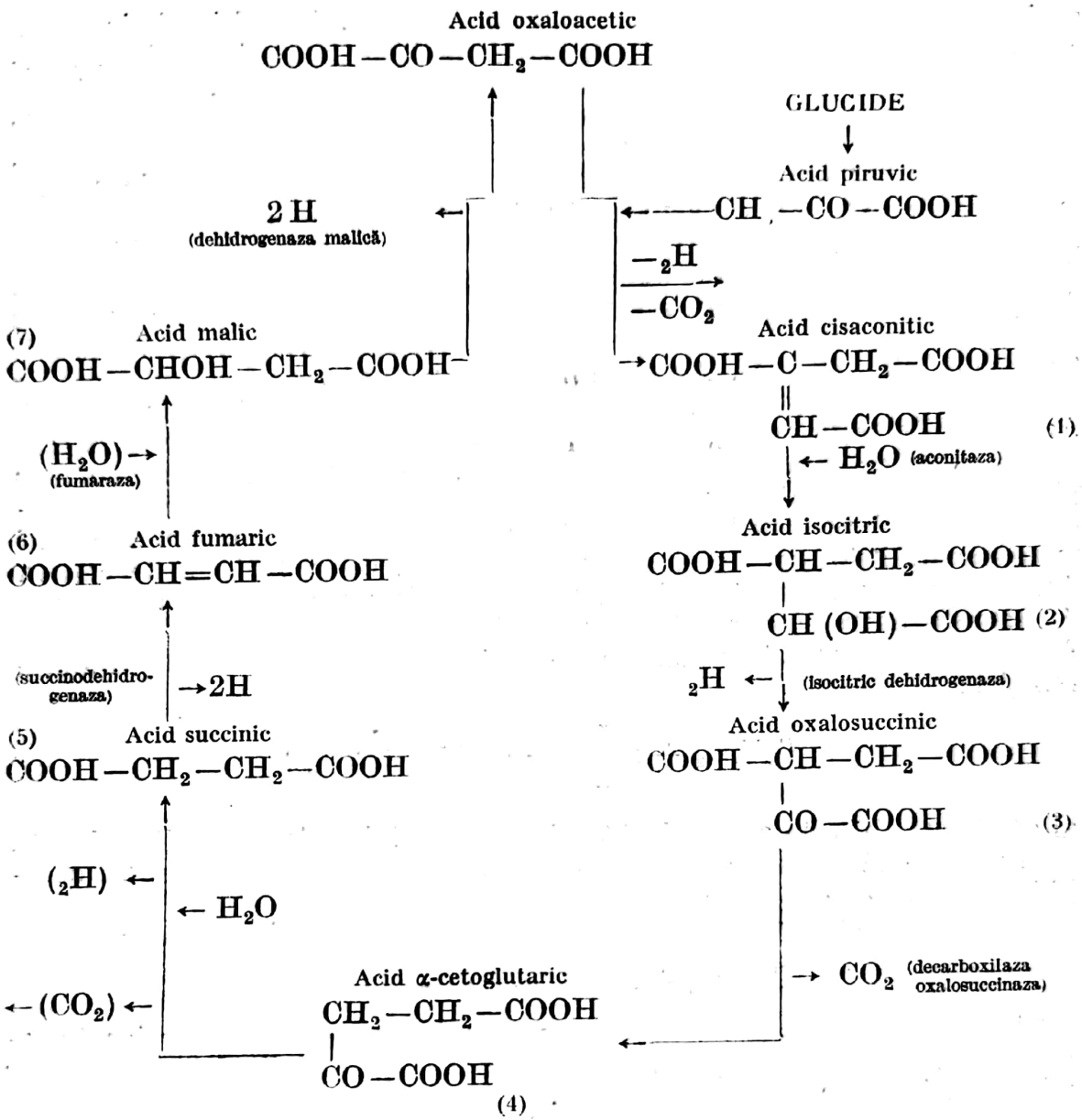
Acidul piruvic, componentă foarte reactivă, se consideră în general ca substanţa cheie dela care începe degradarea oxibiotică. Problema degradării oxidative a glucidelor se reduce astfel la aceea a degradării oxidative a acidului piruvic. Vom analiza deci acest proces.

Metabolismul aerob al acidului piruvic

Vom da o schemă care rezumă ultimele rezultate ale cercetărilor cu privire la degradarea oxidativă a acidului piruvic în ţesutul muscular, schemă ce cuprinde fazele intermediare care duc la CO_2 şi H_2O ca produse finale şi care a fost stabilită de Krebs şi colaboratorii săi. Ei au lucrat pe muşchiul de porumbel. Rezultatele experienţelor lor sunt redate în aşa zisul „*ciclu izocitric*" sau *ciclul tricarboxilic* al lui Krebs şi Martius care — în afară de acizii tetracarbonici dicarboxilici din ciclul lui Szent-Györgyi cuprinde şi tetraacizi tricarboxilici (de unde şi denumirea). In această schemă, reacţiile s'ar petrece în felul următor :

1. **Acidul piruvic** se condensează cu acidul oxaloacetic, trecând în acid cisaconitic prin decarboxilare, fixare de apă şi dehidrogenare sau suferă o decarboxilare cu formare de acid acetic, care se condensează cu acidul oxaloacetic, forma enolică.
2. **Acidul cisaconitic**, trece prin fixarea unei molecule de apă în acid izocitric.
3. **Acidul izocitric** trece prin dehidrogenare în acid oxalosuccinic, care, prin decarboxilare, trece în acid α-cetoglutaric.
4. **Acidul α-cetoglutaric** trece prin dehidrogenare şi decarboxilare în acid succinic.
5. **Acidul succinic** trece prin dehidrogenare în acid fumaric.
6. **Acidul fumaric** trece prin fixare de apă în acid malic.
7. **Acidul malic** trece prin dehidrogenare în acid oxaloacetic ; se regenerează astfel acidul oxaloacetic şi ciclul poate reîncepe :





Ciclul acizilor tricarboxilici.

In acord cu concepțiile actuale se consideră deci că glucidele sunt degradate până la stadiul de acid piruvic ($CH_3—CO—COOH$), trecând prin seria de reacții pe care le-am descris ca aparținând fazei anaerobe de degradare; dar, pe când acidul piruvic, în condiții anaerobe, este degradat în acid lactic, în condiții aerobe suferă o serie de transformări, care sunt redate cel mai verosimil prin etapele cunoscute sub numele de „ciclul acizilor tricarboxilici" (Krebs și Martius).

In prima etapă a oxidării aerobe a acidului piruvic are loc o condensare cu acidul oxaloacetic, prezent în celule ca rezultat al degradării diverselor metabolite; această reacție se face cu eliminare de CO_2 și 2H și formarea unui acid tricarboxilic cu 6 carboni nesaturați, acidul cisaconitic (reacția 1 din schemă). Nu se știe exact dacă reacția are loc direct sau cu formarea de compuși intermediari, nestabili. Acidul cisaconitic este repede hidratat în prezența unei enzime tisulare, aconitaza,

cu formare de acid izocitric (reacţia 2 din schemă). Acidul izocitric suferă o oxidare prin dehidrogenare în prezenţa dehidrogenazei izocitrice cu formare de acid oxalosuccinic (reacţia 3 din schemă); acesta, sub acţiunea decarboxilazei oxalosuccinice, duce la formare de acid α-cetoglutaric şi eliminarea celei de a doua molecule de CO_2 (reacţia 4 din schemă). Acest din urmă compus, prin decarboxilare, eliminarea celei de a treia molecule de CO_2, dehidrogenare şi prin fixare de apă, este transformat în diacid tetracarbonic, acidul succinic. In acest moment, toţi cei 3 atomi de carbon din piruvat sunt oxidaţi în CO_2 şi 2 atomi de hidrogen din cei 4 H, în apă (reacţia 5 din schemă). Acidul succinic, prin dehidrogenare sub acţiunea succinodehidrogenazei, este transformat în acid fumaric (reacţia 6 din schemă). Acesta din urmă suferă o rapidă hidratare în prezenţa enzimei fumaraza, cu formare de acid malic (reacţia 7 din schemă). Acidul malic, prin oxidare sub acţiunea dehidrogenazei malice, formează acidul oxaloacetic şi în acest punct întâlnirea cu o nouă moleculă de acid piruvic, rezultată din catabolismul anaerob al glucidelor, face să reînceapă ciclul. Rezultatul net al ciclului este complecta dispariţie a unei molecule de acid piruvic şi anume eliminarea celor 3 atomi de carbon din moleculă sub formă de CO_2; totodată prin seria de reacţii succesive de dehidrogenare se elimină 5 perechi de atomi de H, deci 10 hidrogeni. Aceste reacţii necesită prezenţa a 5 atomi de oxigen, adică 2,5 O_2 conform reacţiei:

$$C_3H_4O_3 + 2\frac{1}{2}O_2 \rightarrow 3\,CO_2 + 2H_2O$$

al cărei rezultat este o complectă oxidare a acidului piruvic în CO_2 şi H_2O.

Se crede că transportul de hidrogen spre oxigen se face pe calea codehidrazelor I şi II, a flavoproteinelor, a citocromilor.

Pentru degradarea acidului piruvic conform reacţiei generale:

$$C_3H_4O_3 + 2.5\,O_2 = 3\,CO_2 + 2\,H_2O$$

sunt necesare următoarele sisteme: cocarboxilaza, ciclul acizilor tetracarbonici, coenzimele I şi II, flavoproteinele, citocromii, sistemul acizilor adenilici, ionii de Mg^{++} sau Mn^{++}.

Prin combinarea reacţiilor descrise mai sus, care implică formarea acidului piruvic şi participarea lui în ciclul tricarboxilic, se poate arăta complecta oxidare a glucidelor până la produsele finale CO_2 şi H_2O, şi vom vedea că aceste mecanisme pot explica oxidarea oricărei substanţe care poate fi transformată în una din componentele ciclului, cum sunt lipidele sau protidele. Krebs a dat anterior acestei scheme o altă schemă, numită *„ciclul acidului citric"*, în care admite ca produs intermediar obligatoriu al condensării dintre acidul piruvic şi oxaloacetic, acidul citric, intermediar format înaintea acidului cisaconitic. Cercetările ulterioare cu ajutorul ^{1}C marcat arată că acidul citric nu este însă un produs intermediar în cadrul ciclului, ci apare ca un produs colateral.

Ciclul „acizilor tricarboxilici" corespunde cel mai aproape fenomenelor de degradare aerobă a glucidelor. Argumentele care pledează în favoarea procesului ciclic, descris mai sus, se pot rezuma astfel:

1. Componentele intermediare presupuse că ar exista în acest ciclu atunci când sunt adăugate preparatelor tisulare modifică viteza respiraţiei

celulare, şi anume: adăugarea de acid fumaric creşte mult respiraţia celulară. Adăugarea acidului oxaloacetic duce la o rapidă reducere a acestuia de către ţesuturi, cu o viteză egală cu aceea a respiraţiei totale. Componentele acestui ciclu adăugate celulelor în condiţii aerobe sunt deci repede metabolizate.

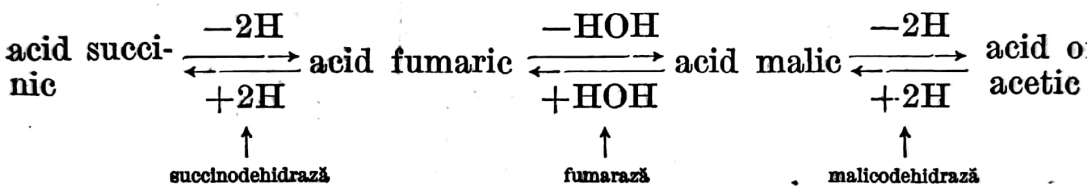
2. S'a reuşit izolarea enzimelor care catalizează reacţiile participante la acest ciclu:

a) *Dehidraza succinică.* In toate ţesuturile există o dehidrază succinică puternică şi această dehidrază acţionează cu o viteză comparabilă cu aceea a vitezei respiraţiei celulare. Ea catalizează reacţia de transformare a acidului succinic în acid fumaric.

Dehidraza succinică este singura care reduce rapid şi direct citocromul; este strict specifică pentru acesta.

Dehidraza succinică este inhibată specific de acidul malonic. Acest acid este în acelaş timp un inhibitor al oxidării acidului piruvic, respectiv al oxidărilor celulare.

b) *Fumaraza*, care catalizează reacţia de transformare a acidului fumaric în acid malic, există în toate ţesuturile. Această enzimă menţine echilibrul între sistemele celor 4 diacizi tetracarbonici, care duc hidrogenul dela acidul succinic la acidul oxaloacetic.



c) *Malicodehidraza* e enzima care catalizează reacţia reversibilă acid malic ⇄ acid oxaloacetic.

3. Unii din compuşii presupuşi intermediari au fost izolaţi din sistemele celulare prin întreruperea reacţiei la un anumit stadiu cu ajutorul toxicelor specifice enzimelor care intervin în acest stadiu, ca de exemplu malonatul şi arsenitul. Reacţiile din ciclul acizilor tricarboxilici explică origina diacizilor tetracarbonici, atât de importanţi în procesele de oxidare celulară, explică participarea în procesul de oxidare a glucidelor a unor componente intermediare, care pot să apară şi din alţi precursori decât cei glucidici, ca de exemplu din lipide sau din aminoacizi.

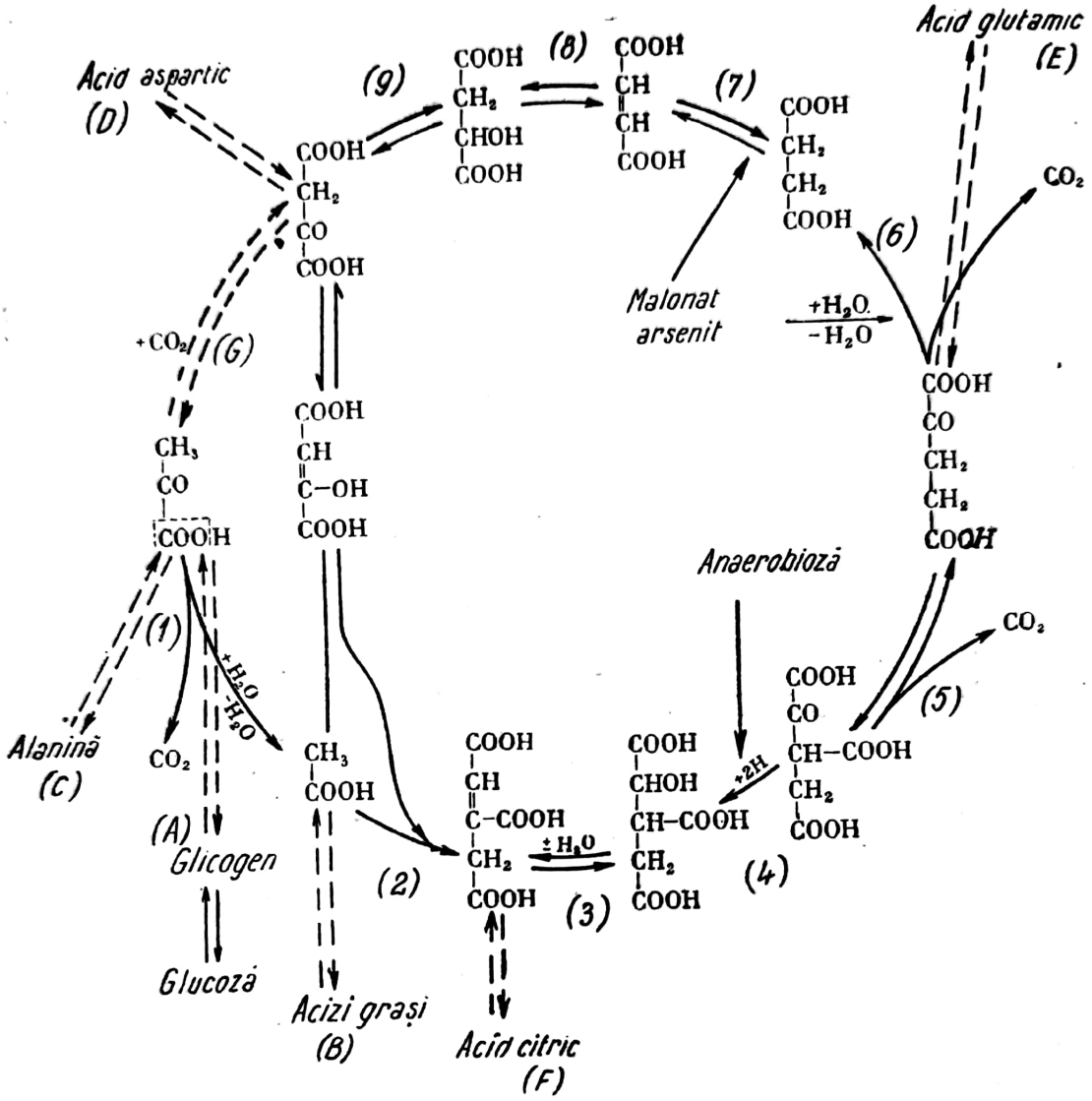
Reacţiile din ciclul acizilor tricarboxilici fiind reversibile, existenţa acestor compuşi de origină neglucidică poate explica interrelaţia dintre metabolismul glucidic-lipidic-protidic, prin intermediul unor precursori chimici comuni diverselor metabolisme. Schema alăturată redă acest lucru.

Acidul piruvic e foarte reactiv şi participă la o mare varietate de reacţii, fiind considerat ca punctul de legătură către care converg reacţiile anabolice şi catabolice ale glucidelor, lipidelor, protidelor.

Sistemul acizilor tricarboxilici este foarte important prin stabilirea punctelor de legătură ale diverselor metabolisme intermediare. Enzimele care intervin în acest ciclu (succinodehidrogenaza, malicodehidrogenaza, fumaraza, aconitaza) (vezi tabelul 23) sunt tot atât de răspândite în celule ca şi citocromul şi citocromoxidaza.

Scanned with OKEN Scanner

Ciclul tricarboxilic

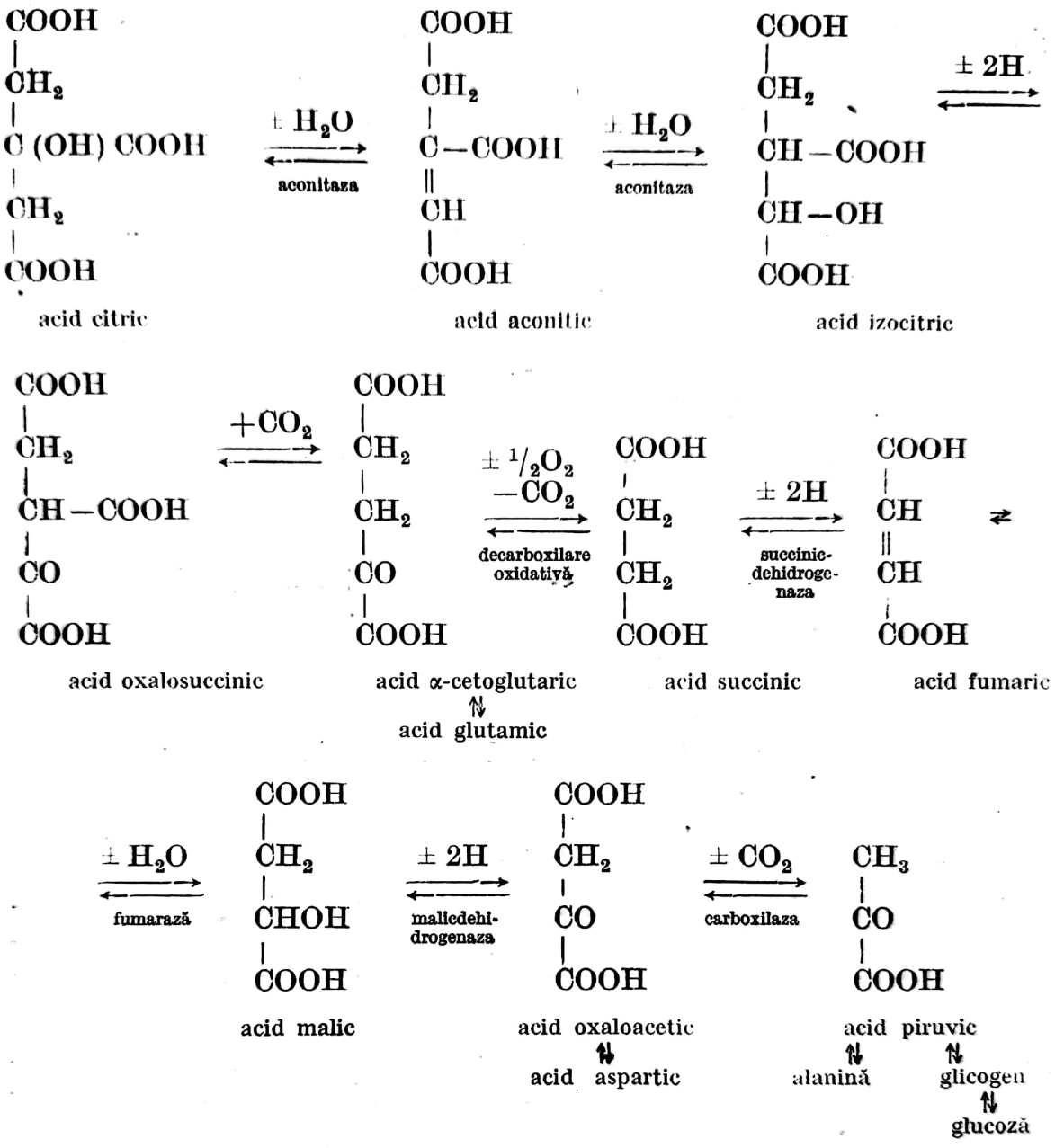


Tabelul 23

Enzimele implicate în ciclul tricarboxilic

Reacția Nr.	Enzime și coenzime	Reacția Nr.	Enzime și coenzime
1	Sistemul de decarboxilare oxidativă	10	Spontană
2	Citrogenaza	A.	Sistem glicolitic
3	Aconitaza	B.	„ enzimatic de sinteză a grăsimilor
4	Izocitricdehidrogenaza Co II	C.	Transaminaza
5	Oxalosuccinicdecarboxilaza	D.	Transaminaza
6	Sistem de decarboxilare oxidativă	E.	l-glutamicdehidrogenaza + Co I
7	Succinicdehidrogenaza	F.	Aconitaza
8	Fumaraza	G.	β-carboxilaza
9	Malicodehidrogenaza, Co I		

Scanned with OKEN Scanner



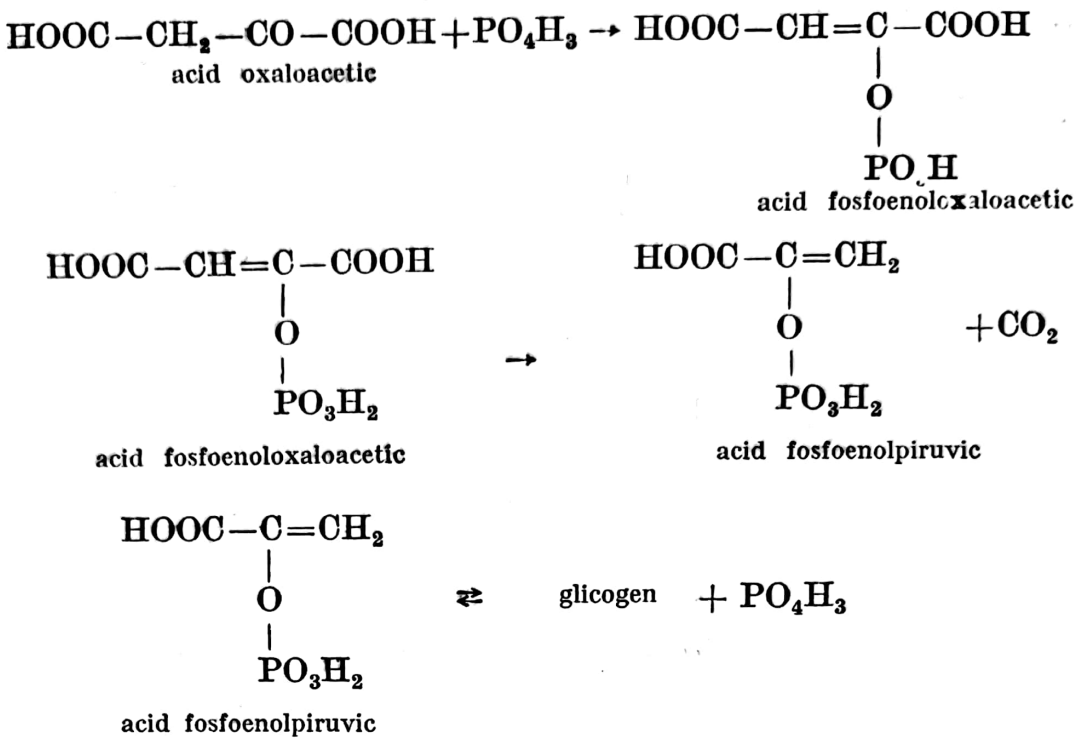
Schema reacţiilor care conduc dela citrat la piruvat cu indicaţia interrelaţiilor metabolice

RESINTEZA GLUCIDELOR

Mecanismul resintezei glucidelor poate fi explicat dacă se ia în seamă că toate reacţiile care intervin în formarea acidului piruvic sunt reversibile (cu excepţia defosforilării acidului fosfoenolpiruvic). Sinteza necesită însă un aport de energie, care este dată de reacţiile de oxidoreducere simultane. Sinteza glicogenului este deci un proces aerob. Ea poate fi realizată pe calea ciclului acizilor dicarboxilici, care la rândul lor pot proveni din acidul piruvic prin fixare de CO_2 şi formare de acid oxaloacetic. Această reacţie a fost dovedită posibilă:

$$\underset{\text{acid piruvic}}{CH_3-CO-COOH} + CO_2 \rightleftarrows \underset{\text{acid oxaloacetic}}{COOH-CH_2-CO-COOH}$$

și arată calea de sinteză a glicogenului prin următoarele reacții :



Folosindu-se CO_2 cu C izotop, s'a dovedit că CO_2 este încorporat în molecula glicogenului.

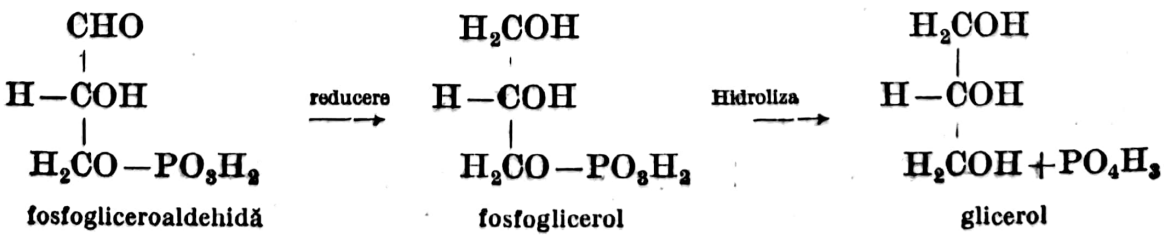
Formarea glucidelor din aminoacizi

Reacțiile din ciclul acizilor tricarboxilici dau o explicație asupra capacității unora din aminoacizi de a forma glucoza sau glicogenul. Intr'adevăr, acidul glutamic trece prin desaminare în acid α-cetoglutaric, acidul aspartic în acid oxaloacetic, alanina în acid piruvic.

Deci, prin desaminare, acești aminoacizi devin direct componente identice cu acelea ce rezultă din metabolismul glucidelor. Deoarece reacțiile ciclului tricarboxilic sunt reversibile, acești compuși pot duce la sinteza glucidelor.

Transformarea glucidelor în grăsimi

Este un fapt sigur că glucidele pot fi transformate în grăsimi în organismul animal. Glicerolul necesar sintezei grăsimilor rezultă destul de ușor din glucide. Din fosfogliceroaldehidă, printr'un proces de reducere, se ajunge probabil la fosfoglicerol care, prin hidroliză, duce la glicerol.



DEGRADAREA GLUCIDELOR IN ALTE ŢESUTURI DECÂT CEL MUSCULAR

Există indicaţii că şi alte ţesuturi decât muşchiul, şi anume ficatul, rinichiul, creierul, etc., ar scinda pe aceeaşi cale glucidele şi că ATF ar fi componenta prin care se face depozitarea energiei din sursa glucidică sub formă uşor accesibilă.

A. Degradarea glucidelor în sânge

Glicoliza sanguină. Pentru globulul roşu s'a putut arăta că există o degradare a glucozei în acid lactic care se face, ca şi în muşchi, prin fosforilare, şi urmează aceleaşi stadii intermediare.

In vivo, această degradare este însă redusă, totuşi există, deoarece se găseşte acid lactic într'o concentraţie de aproximativ 7—13 mg%.

In vitro, însă, în prezenţa globulului roşu, glicoliza este foarte intensă. Se pot distruge cam 1,50 g $^0/_{00}$ în 24 sau 48 de ore. Acest fenomen face ca în sângele scos din circulaţia sanguină glicemia să scadă pe măsură ce e lăsat să stea ca atare. Deasemenea dacă unui sânge i se adaugă glucoză, această glucoză este degradată. Este vorba aici de o acţiune diastazică datorită unei enzime sau unui sistem enzimatic care catalizează această degradare. Pentru fiecare moleculă de glucoză apar 2 molecule de acid lactic. Paralel cu această glicoliză apare şi acid fosforic, ceeace confirmă faptul că glicoliza în sânge se face cu intervenţia fosfaţilor şi nu este o glicoliză afosforilată. Existenţa acestei glicolize intense in vitro impune ca absolut necesare anumite precauţii atunci când se fac determinări ale glucozei sanguine, şi anume, trebue realizate condiţiile ca această glicoliză să fie oprită. Am văzut că fluorurile alcaline opresc glicoliza în muşchi. Adăugând fluorură de sodiu sângelui, se opreşte glicoliza în sânge. Deaceea, ca indicaţie practică indispensabilă este de reţinut următoarea: sângele scos pentru determinările de glicemie trebue prelevat pe fluorură de sodiu (sau amoniu), pentru a evita erorile datorite glicolizei.

B. Degradarea glucidelor în centrii nervoşi

Se face prin ambele mecanisme: unul fosforilat, ca în muşchi şi globule roşii, şi unul afosforilat: se pare că acesta din urmă predomină. (Amănunte sunt date la capitolul „Biochimia ţesutului nervos").

C. In ţesutul embrionar şi tumori

Predomină deasemenea glicoliza afosforată.

Ficatul nu ar avea o glicoliză normală.

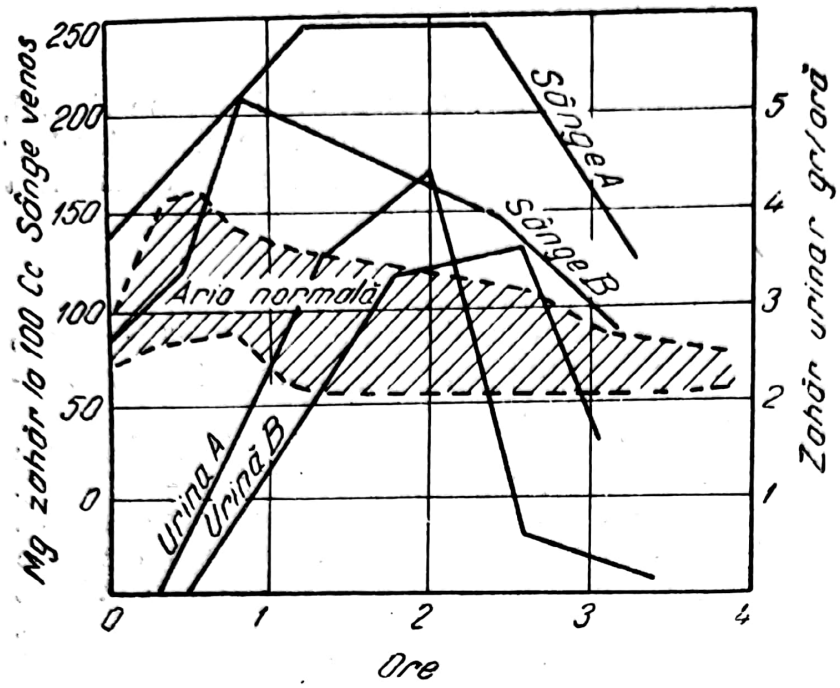
Rinichiul, suprarenala, splina, pancreasul, tiroida prezintă o degradare slabă a glicogenului în acid lactic.

TURBURĂRI ALE METABOLISMULUI NORMAL AL GLUCIDELOR

Se pot produce turburări în metabolismul normal al glucidelor din diverse cauze:

I. printr'o hiper- sau hipofuncţie a organelor glucoreglatoare; de exemplu, turburări în funcţia pancreasului, ficatului, tiroidei, hipofizei, suprarenalei;

Scanned with OKEN Scanner



Curbele A şi B în diabet.

Fig. 104. Curba zahărului din sângele venos şi din urină după ingerarea a 100 g glucoză.

II. printr'o modificare a permeabilităţii renale;

III. prin carenţa unor factori exogeni (vitamine B în special), necesari metabolismului normal al glucidelor.

Diabetul zaharat (diabetes mellitus)

Este o boală datorită unei insuficiente secreţii insulinice. Se poate realiza experimental prin extirparea pancreasului şi am văzut la capitolul despre insulină care sunt simptomele cardinale ale diabetului zaharat.

1. **Glicozuria** este datorită nu unei scăderi a permeabilităţii renale pentru glucoză, ci unei hiperglicemii, deci unei creşteri a glucozei în sânge peste limitele normale ale permeabilităţii renale. Pragul de eliminare a depăşit şi intervine rinichiul ca organ reglator al glicemiei, eliminând excesul.

2. **Hiperglicemia** diabetică poate ajunge până la 3—4 g la 1000 cc; în genere este peste 2 g $/_{00}$ (fig. 104—105). Am văzut la capitolul reglării glicemiei cum se explică hiperglicemia. Ea este provocată de o hiposecreţie insulinică, de unde derivă o insuficientă utilizare a glucidelor. Celelalte simptome ale diabetului am văzut că sunt:

3. **Poliuria**

4. **Polifagia**, consecinţe ale metabolizării defectuoase a glucidelor.

5. **Acidoza** diabetică este şi ea o consecinţă a incapacităţii organismului diabetic de a utiliza glucoza. Ea constă în apariţia în urină a corpilor cetonici; acetonă, acid acetil — acetic şi acid β-oxibutiric, rezultaţi din arderea incomplectă a acizilor graşi, deoarece energia necesară combustiei acizilor graşi e furnizată de arderea glucidelor. Aceasta fiind incomplectă, şi arderea acizilor graşi e incomplectă. Apariţia de corpi cetonici duce la o modificare a rezervei alcaline şi chiar a pH-ului în sensul unei acidoze. Vom vedea acest lucru în detaliu la capitolul metabolismului lipidelor. Apariţia de corpi cetonici în urină este de un prognostic nefavorabil, deoarece poate duce la coma diabetică. Deaceea este importantă în clinică cercetarea corpilor cetonici în urină şi chiar dozarea lor în sânge.

Diabetul florizinic

Este un diabet experimental care se realizează prin injecţia glicozidului florizina. Acţiunea acestui glicozid se exercită asupra permeabilităţii renale pentru glucoză. Glicemia poate fi însă normală sau chiar scăzută.

Scanned with OKEN Scanner

deci glicozuria florizinică nu este datorită unei hiperglicemii, ci unei scăderi a pragului de eliminare renală. Dacă se dă unui animal florizinizat să ingere glucide, el elimină prin urină chiar mai mult decât a ingerat, ceeace se explică printr'o neoformare de zahăr din proteine, respectiv

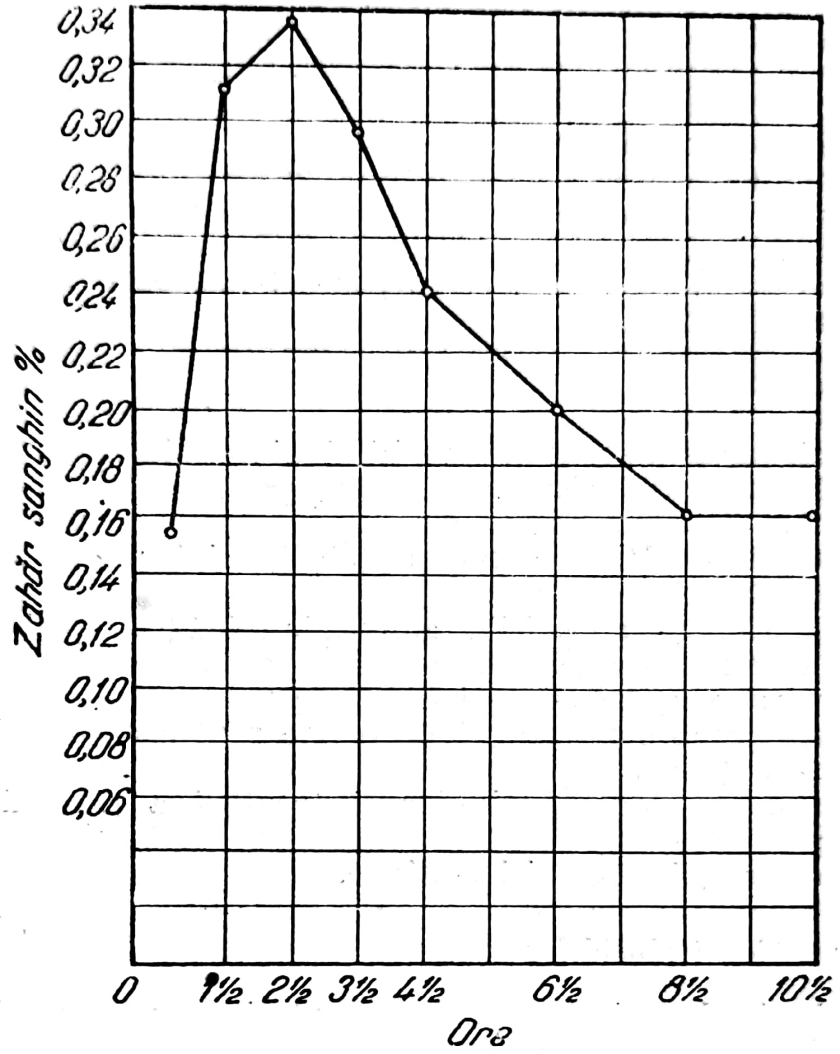


Fig. 105. Curba zahărului sanguin după ingestie de glucoză la un diabetic.

din acizi aminați, lucru care se observă de altfel și în diabetul zaharat. Se știe că diabeticii, începând dela un anumit stadiu al bolii, slăbesc din cauză că organismul lor, neputând arde complect glucidele, recurge la alte rezerve și realizează o neoformare de glucide din proteine și poate din grăsimi.

Florizina influențează însă nu numai permeabilitatea renală pentru glucoză, ci și metabolismul glucidelor. Ea inhibă degradarea acestora la un anumit stadiu, fiind un toxic al enzimelor implicate în metabolismul lor.

Hiperglicemii nediabetice

Hiperglicemiile nediabetice există în cazul unei turburări a funcției ficatului și sunt probabil legate de insuficiența glicogenopexică (de sinteză a glicogenului în ficat). Proba funcției hepatice am spus că se face prin

așa numita probă a galactozuriei provocate, galactoza neputând fi utilizată decât de ficat; orice alterare a funcției ficatului duce la o eliminare a galactozei (netransformate) direct în urină.

Există hiperglicemii tiroidiene, hipofizare, suprarenale, etc., după cum am văzut la capitolele respective.

Lipsa unor factori exogeni, cum sunt vitaminele, de exemplu vitamina B, care este o componentă a cocarboxilazei, sau flavinele, care am văzut că au un rol important în degradarea glucidelor, poate provoca turburări în metabolismul normal al acestora.

Glicozuria alimentară este datorită unui aport excesiv de glucide în alimentație, ceeace duce la o imposibilitate de a depozita excesul de glicogen, de unde hiperglicemie inițială și ulterior glicozurie, ca o consecință a acesteia. Această hiperglicemie și glicozurie, încetează când alimentația redevine normală.

Diabetul renal

Este boala în care se constată apariția de glucoză în urină fără o creștere a glucozei în sânge, deci glicozurie fără hiperglicemie. Cauza este o creștere a permeabilității renale pentru glucoză.

Controlul clinic al turburărilor metabolismului normal al glucidelor se face:

1. prin controlarea apariției de glucoză în urină (controlul glicozuriei);
2. prin determinarea glicemiei;
3. cercetarea corpilor cetonici în urină;
4. se face proba galactozuriei provocate pentru a controla dacă nu este o insuficiență hepatică;
5. determinarea rezervei alcaline și eventual a pH-ului în cazuri mai grave;
6. dozarea corpilor cetonici în sânge.

Rolul plastic al glucidelor

Rolul plastic al glucidelor este important, deși nu primordial, ca rolul lor energetic.

1. Glicogenul este un constituent al tuturor țesuturilor și, în afară de rolul său energetic, are probabil și un rol plastic. In special diverși compuși ai zaharurilor au acest rol plastic.
2. Galactoza e o componentă a lipidelor cerebrale, a cerebrozidelor (galactolipide), a unor glucoproteide (condrosamina din acidul condroitinsulfuric din cartilaje, care este o galactosamină)..
3. Pentozele riboza și ribodesozele fac parte din structura nucleozidelor de adenină, guanină, hipoxantină.

METABOLISMUL LIPIDELOR

Am văzut că în grupa lipidelor se clasifică o serie de compuși caracterizați prin insolubilitatea lor în apă și solubilitatea lor în solvenții organici eter, cloroform, benzen, tetraclorură de carbon. In această clasă sunt cuprinse:

1. *grăsimile* neutre sau gliceridele, esteri ai acizilor grași cu glicerolul;

2. *fosfatidele* sunt esteri ai acizilor graşi cu glicerolul conţinând în moleculă o bază azotată (colina sau colamina) ca în lecitine şi cefaline, sau esteri ai acizilor graşi cu sfingozina, ca în sfingomieline. Toate conţin acid fosforic în moleculă;

3. *cerebrozidele*, esteri ai acizilor graşi cu sfingozina, care conţin în moleculă şi galactoză;

4. *steridele*, esteri ai acizilor graşi cu sterolii (alcolii ciclici);

5. *lipocromii*, care conţin în moleculă acizi graşi şi carotenoizi.

Studiul metabolismului intermediar al lipidelor va trebui deci urmărit pentru fiecare grupă în parte şi la fiecare grupă, pentru fiecare componentă constitutivă a moleculei corespunzătoare.

Studiul metabolismului intermediar al lipidelor a fost în ultimul timp lămurit în multe din punctele sale obscure, prin utilizarea izotopilor grei şi a izotopilor radioactivi, şi anume a hidrogenului greu (deuterium), a carbonului greu, a fosforului radioactiv — încorporaţi, în molecula acizilor graşi, şi administraţi animalelor de experienţă. Acizii graşi păstrează în cursul transformărilor lor în organism aceşti atomi izotopi, ceeace permite urmărirea lor. Tot cu ajutorul izotopilor s'a dovedit şi capacitatea organismului de a sintetiza acizii graşi din diverse alte componente nelipidice.

Origina lipidelor. Lipidele din organismul animal provin din două surse principale: 1) lipidele din alimentaţie şi 2) din protidele şi, în special, din glucidele din alimentaţie; există deci o neoformare a lipidelor din glucide şi probabil şi din protide. Neoformarea lipidelor din glucide are loc în ficat.

Forma de transport a lipidelor în organism se crede că ar fi aceea de fosfatide, fapt controlat cu ajutorul ^{32}P radioactiv.

Depozitarea lipidelor în organism se face în ficat şi în ţesutul adipos. In celulele adipoase, grăsimile sunt depuse sub formă de picături fluide la temperatura corpului, constituind grăsimile de depozit.

Rolul lipidelor este foarte important; ele reprezintă pentru organism un depozit energetic concentrat, cea mai economică cale de rezervă de energie. Astfel, 1 g lipide eliberează 9,3 calorii în comparaţie cu 4,5 calorii pe care le eliberează 1 g glucide sau protide. Deasemenea, depozitarea a 100 de calorii se poate realiza într'un spaţiu de 12 cc ţesut adipos care cântăreşte 11 grame, depozitarea aceleiaşi energii potenţiale sub formă de glicogen necesitând 130 grame.

In afară de aceasta, lipidele mai au şi funcţii neenergetice importante. Astfel: sunt solvenţii şi vehiculul vitaminelor liposolubile A, D, E, K, influenţează diversele procese ale digestiei şi absorbţiei unor alimente, viteza de calcificare a oaselor. Unii acizi graşi ar avea funcţii specifice. Se pare că organismul nu poate sintetiza acizii graşi cu mai mult de o legătură dublă. Acidul linoleic şi arahidonic nu pot lipsi din alimentaţie.

Enzimele care intervin în metabolismul lipidelor sunt esterazele (lipazele, fosfatazele, etc.).

METABOLISMUL GRĂSIMILOR NEUTRE

DIGESTIA ŞI ABSORBŢIA GRĂSIMILOR NEUTRE

Digestia şi absorbţia grăsimilor neutre pun o problemă nouă, diferită de aceea a digestiei şi absorbţiei glucidelor sau protidelor, datorită caracteristicii acestor compuşi de a fi insolubili în apă, deci şi în apa din celule.

Această proprietate va cere, atât pentru acțiunea enzimelor specifice de degradare, cât și pentru absorbția acestor compuși, intervenția unor mecanisme suplimentare care să facă posibile aceste procese fiziologice.

A. *Digestia grăsimilor*

Saliva nu conține lipază, astfel că digestia grăsimilor începe deabia în intestinul subțire; sub acțiunea lipazei pancreatice și a acizilor biliari sunt scindate în cele două componente: glicerol și acizi grași. Acțiunea lipazei este eficace numai atunci când se poate stabili o suprafață de contact între această enzimă și substratul sau grăsimea neutră și este cu atât mai eficace cu cât această suprafață de contact este mai întinsă, deci cu cât grăsimile vor fi mai fin divizate, mai bine emulsionate. Emulsionarea se face sub acțiunea tensioactivă a acizilor biliari din bilă care realizează o reducere a tensiunii superficiale la interfața grăsime/apă, stabilizând totodată emulsia. Prin aceasta, fac posibilă acțiunea hidrolitică a lipazei, care duce la formare de glicerol și acizi grași, componente care urmează a fi absorbite separat prin peretele intestinal.

Hidroliza grăsimilor în constituenții lor, acizi grași și glicerol, este necesară pentru posibilitatea de absorbție a acestora.

B. *Absorbția*

Absorbția glicerolului prin peretele intestinal este simplă, acest compus fiind solubil.

Absorbția acizilor grași pune o nouă problemă. Aceștia fiind insolubili, absorbția lor necesită o prealabilă transformare în compuși solubili. După Verzar, solubilizarea s'ar face sub acțiunea acizilor biliari: 1 moleculă acid gras la 8 molecule acizi biliari. Aceștia, printr'un proces cunoscut sub numele de hidrotropie, transformă acizii grași în compuși solubili și ușor difuzabili, care pot pătrunde împreună cu glicerolul în mucoasa intestinală, unde se recombină, resintetizând grăsimile neutre; așa se explică apariția de grăsimi neutre în limfaticele intestinale în timpul absorbției grăsimilor. Intestinul este deci organul în care sunt sintetizate grăsimile. Resinteza însă nu se face direct, ci este condiționată de o prealabilă fosforilare cu formare de fosfolipide. Fosfolipidele ar juca astfel rolul de compuși intermediari în resinteza grăsimilor, care are loc în mucoasa intestinală.

Faptele experimentale care pledează pentru această interpretare sunt următoarele:

1. inhibitorii fosforilării (florizina, acidul monoiodacetic) inhibă și absorbția grăsimilor;

2. suprarenalectomia împiedică absorbția grăsimilor, iar administrarea de cortină readuce la normal viteza de absorbție;

3. hrănirea animalelor cu acizi grași conținând atomi izotopi D^2 provoacă o imediată apariție a acestor acizi grași în fracțiunea fosfolipidică din mucoasa intestinală.

Se pare că acizii grași mai pot fi absorbiți în mucoasa intestinală și sub forma de combinații cu acizii biliari și sub formă de esteri ai colesterolului (sub acțiunea colesterazei), în raport cu natura acidului gras.

Sinteza grăsimilor neutre pe calea formării intermediare de fosfolipide e un factor de accelerare a absorbției grăsimilor ca și fosforilarea în cazul

absorbției glucidelor. Nu toate fosfolipidele formate servesc la resinteza grăsimilor neutre, o parte din ele se mențin ca atare și trec în circulație. Fosforilarea lipidelor după desfacerea lor este un mecanism general pentru facilitarea transportului acestor compuși în organism. După absorbția lor, acizii grași se recombină probabil cu glicerolul și acesta, prealabil fosforilat, reformează grăsimile neutre, care trec în vasele chilifere, iar o mică parte, prin vena portă, ajung și se fixează în ficat. Glicerolul singur sau fosfatul singur nu accelerează absorbția, dar ambele, împreună, o măresc de două-trei ori.

Din vasele chilifere, ocolind deci ficatul, lipidele sunt duse în depozitele adipoase. De aci, după necesitățile organismului, sunt mobilizate și duse diverselor organe. Colina ar avea un rol important în transportul și depozitarea grăsimilor în organism. Cele două forme sub care se depozitează lipidele în organism sunt : aceea a lipidelor de rezervă și aceea a lipidelor protoplasmatice.

1. **Lipidele de rezervă** sunt localizate în anumite regiuni anatomice constituind țesutul adipos, care reprezintă rezerva de lipide pentru organism. In afară de acest rol îl au și pe acela de izolator de temperatură, deci rol termoreglator. Compoziția lipidelor de rezervă variază cu o serie de factori și în special cu alimentația, apoi cu temperatura mediului, cu climatul, cu regiunea, unde sunt localizate. Se pot diferenția între ele, prin punctul lor de fuziune și prin cifra de iod (vezi tabelul 24).

Tabelul 21

Caracterele chimice și fizice ale diverselor grăsimi

	Punct de fuziune	Indice de saponificare	Indice de iod	Conținut în oleină ‰
Grăsime de om	17,5°	193—199	57—66	66—87
Grăsime de oaie.	26—34°	—	58—71	61—68
Unt de vacă.	31—35°	220—230	26—38	28—40
Unt de femeie.	28°	—	53	67
Grăsime de porc.	36—46°	195—197	50—70	43,4
				acid linolenic 10%
Grăsime de cal	35—39°	—	77—80	70
Seu de bou.	42—40°	193—200	35—45	21,4
Seu de oaie.	49—51°	—	32—46	17

Influența factorilor externi asupra lipidelor de rezervă

Influența alimentației este foarte mare; astfel, locuitorii din Laponia, care se hrănesc în special cu grăsime de focă sau de balenă, au grăsimea cu punctul de fuziune al grăsimii acestor animale. Locuitorii din Polinezia, care se hrănesc în special cu nuci de cocos, au o grăsime cu punctul de fuziune asemănător cu acela al untului de cocos. Dacă se hrănesc animale cu untdelemn, grăsimile lor devin fluide.

Influența climatului e netă. Porcii menținuți 2 luni la temperatura de 30—35° au o grăsime cu un punct de fuziune cu 2° mai ridicat decât aceleași animale hrănite la fel, dar menținute același interval de timp la temperatura de 0°.

Dacă se supune un animal inaniției prelungite, rezerva de grăsimi scade foarte mult, dar rămâne totuși, o cantitate care pare să constitue

o componentă structurală: este așa numitul „*element constant*", restul fiind „*elementul variabil*", care variază cu diversele cauze exterioare enumerate înainte.

Localizarea grăsimilor are și ea influență asupra compoziției grăsimilor de rezervă. De exemplu, grăsimile subcutanate au un punct de fuziune mai scăzut, ele rămânând semifluide; cele din profunzimea pielei, la aceeași temperatură, sunt mai consistente. Acest fapt indică o compoziție diferită a acestor grăsimi, depinzând de conținutul lor în acizi grași, deci, contrar glucidelor care, sub orice formă ar fi ingerate sunt transformate în același compus de depozitare, glicogenul.

E interesant însă de amintit că lipidele de rezervă, rezultate printr'o neoformare din glucide sau protide, au o compoziție constantă; ele constitue așa numitele rezerve sintetice sau rezervele fiziologice.

Grăsimile din depozit nu reprezintă un material inert de depozitare și experiențe făcute cu grăsimi conținând hidrogen greu ^2D au arătat că acest depozit participă în mod continuu la procesele metabolice ale grăsimilor.

Grăsimile de depozit apar la microscop sub forma de picături. Conțin în general 95% acizi grași saturați. Grăsimile din ficat conțin însă mai mulți acizi grași nesaturați decât țesutul adipos; se crede că acest organ ar avea proprietatea să selecționeze și să rețină acești compuși din sânge.

2. **Lipidele protoplasmatice** sunt lipidele din celule; se mai numesc și lipide de structură sau constituționale sau de organe; provin tot din lipidele de rezervă, dar, spre deosebire de acestea, au o structură constantă și specifică fiecărui organ și specie, sunt organospecifice și speciespecifice. Compoziția lor și cantitatea în care se găsesc este constantă și independentă de alimentație, constituind astfel o componentă celulară caracteristică (ca și proteidele).

Neoformarea lipidelor

Neoformarea lipidelor poate avea loc din glucide și, probabil, și din protide. Acest lucru a fost dovedit, în special pentru glucide, prin experiențe pe animal. Procesul este chimic posibil, deoarece unele produse intermediare care apar în cursul degradării lipidelor sunt identice cu acelea care apar în cursul degradării glucidelor și chiar a protidelor, după cum vom vedea ulterior. Transformarea glucidelor în lipide se manifestă printr'o variație caracteristică a coeficientului respirator R_Q, specific fiecărei clase de compuși. Transformarea glucidelor în lipide are loc în ficat, fosfatidele înseși având rol de catalizator în aceste transformări.

Există o serie de acizi grași, pe care organismul animal nu-i poate sintetiza: sunt așa numiții acizi grași esențiali, acizi grași nesaturați (linoleic, linolenic, arahidonic), indispensabili creșterii, și a căror lipsă din alimentație produce la șobolani, leziuni cutanate caracteristice. Acești acizi au fost socotiți de unii autori ca fiind vitamina F.

Forma de transport a lipidelor în organism

Transportul lipidelor în organism se efectuează în două sensuri, și anume:

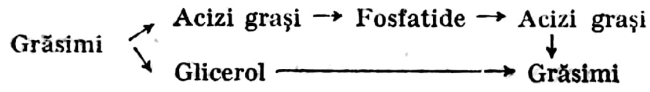
1. transportul lipidelor pornind dela suprafața de resorbție intestinală până la regiunea de depozitare sau de degradare a lor și

2. transportul lipidelor din regiunea de depozitare (ţesutul adipos) în diversele organe.

Forma de transport în ambele cazuri se pare că este aceea de fosfolipide şi în special de lecitine.

Fosfatidele sunt forma de vehiculare a acizilor graşi, lucru care a fost dovedit şi cu ajutorul ^{32}P încorporat în molecula acestor compuşi. Rolul acesta vehiculant este datorit caracterului hidrofil al acestor compuşi, spre deosebire de acizii graşi, care au un caracter hidrofob şi deci sunt insolubili în lichidele din organism. Transportul fosfatidelor se face pe cale sanguină; într'adevăr, după o alimentaţie bogată în grăsimi creşte conţinutul în fosfatide din sânge (lecitinemie marcată).

Experienţe făcute pe animalele hrănite cu fosfat disodic conţinând ^{32}P au arătat că fosfolipidele din organism sunt în continuă transformare, se distrug şi se sintetizează continuu, eliberând acizii graşi şi reformându-se din nou din aceşti acizi graşi sub formă de fosfatide caracteristice fiecărui ţesut şi fiecărui organ. Se crede că majoritatea fosfatidelor sunt sintetizate în ficat şi în general ficatul ar avea rolul predominant în metabolismul grăsimilor. Pentru acest lucru pledează o serie de fapte, şi anume: acizii graşi combinaţi în fosfolipidele hepatice sunt mai nesaturaţi decât acizii graşi din alte ţesuturi. Ficatul poate acumula cantităţi mai mari de grăsimi decât oricare ţesut. Ficatul este locul de formare a corpilor cetonici. Viteza de transformare a fosfolipidelor e mai mare în ficat decât în oricare ţesut, cu excepţia mucoasei intestinale în timpul absorbţiei. Se presupune că grăsimile sunt scindate în glicerol şi acizi graşi.



OXIDAREA GRĂSIMILOR NEUTRE

Grăsimile neutre conţin 9/10 din greutatea lor acizi graşi şi 1/10 glicerol, iar degradarea lor începe prin scindare hidrolitică sub acţiunea lipazei în aceste două componente. Toate celulele conţin o lipază caracteristică, capabilă să realizeze această hidroliză şi în acelaş timp capabilă să catalizeze reacţia reversibilă de sinteză. Problema degradării oxidative a grăsimilor neutre se reduce astfel la problema degradării oxidative a acestor două componente; glicerolul şi acizii graşi.

I. Oxidarea glicerolului

O parte din glicerolul rezultat din scindarea hidrolitică este reutilizată pentru resinteza grăsimilor neutre, iar o parte este oxidată pe calea de oxidare a glucidelor, după o prealabilă fosforilare în fosfoglicerol, transformare în aldehidă fosfoglicerică, acid fosfogliceric, acid piruvic, acid lactic. Astfel glicerolul poate lua parte la glicogenogeneză prin resinteza glicogenului din acid lactic. Ficatul perfuzat cu glicerol formează acid lactic.

II. Oxidarea acizilor graşi

A doua componentă din molecula grăsimilor neutre, cere însă mecanisme de degradare speciale. Degradarea lor constitue sursa energetică potenţială importantă din grăsimi, aceste componente constituind din punct de vedere ponderal cea mai mare parte din greutatea grăsimilor neutre (9/10 din greutatea lor).

Acizii graşi naturali, saturaţi sau nesaturaţi, au un număr pereche de atomi de carbon. Sunt acizi graşi cu o catenă lungă (4—22 de carboni) şi astfel se pune imediat problema mecanismului prin care acest lung lanţ de carboni este scindat şi degradat până la produsele finale, CO_2 şi H_2O. Se credea că, premergător degradării lor, acizii graşi saturaţi sunt desaturaţi; experienţa ulterioară cu hidrogen greu au arătat însă că nu este necesară o desaturare prealabilă ci, dimpotrivă acizii graşi nesaturaţi, ca de exemplu acidul oleic, suferă o hidrogenare imediată. Totuşi, ficatul are capacitatea de a introduce în acizii graşi dubla legătură, şi anume, în poziţia $\alpha : \beta$. Desaturarea se face deci în poziţia $\alpha : \beta$.

Asupra mecanismului de oxidare a acizilor graşi există două teorii mai importante: teoria β-oxidării (a lui Knoop) şi teoria ω-oxidării (a lui Verkade).

Se admite în general că majoritatea acizilor graşi sunt oxidaţi prin procesul β-oxidării.

1. **Teoria β-oxidării acizilor graşi** admite că lanţul acidului gras este oxidat la nivelul carbonului β (în raport cu gruparea carboxilică). Oxidarea se face prin dehidrogenarea grupării metilice CH_2, formare intermediară de acid gras nesaturat şi ulterioară scindare hidrolitică la legătura dublă cu eliminarea a 2 atomi de carbon din lanţul acidului gras (carbonul α şi carbonul carboxilic). Ruperea se face între carbonul α şi β. Oxidarea se face prin dehidrogenare şi hidratare succesivă cu eliminarea succesivă a câte unei molecule de acid acetic şi a unui acid gras cu moleculă din ce în ce mai mică. Astfel, un exemplu este acidul octanoic:

$$CH_3-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-\underset{\beta}{CH_2}-\underset{\alpha}{CH_2}-COOH$$

acid octanoic

$$\downarrow$$

$$CH_3-CH_2-CH_2-\underset{\beta}{CH_2}-\underset{\alpha}{CH_2}-COOH + CH_3-COOH$$

acid hexanoic — acid acetic

$$\downarrow$$

$$CH_3-\underset{\beta}{CH_2}-\underset{\alpha}{CH_2}-COOH + CH_3-COOH$$

acid butiric — acid acetic

$$\downarrow \qquad \downarrow$$

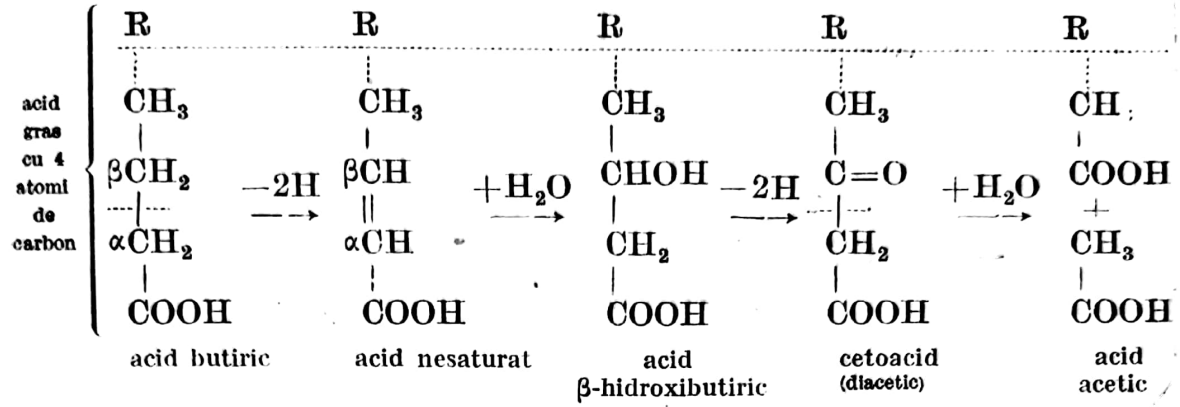
$$CH_3COOH \qquad CH_3-COOH$$

acid acetic — acid acetic

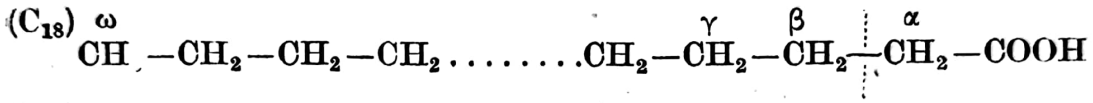
$$4\,CH_3COOH = 2CH_3-CO-CH_2-COOH$$

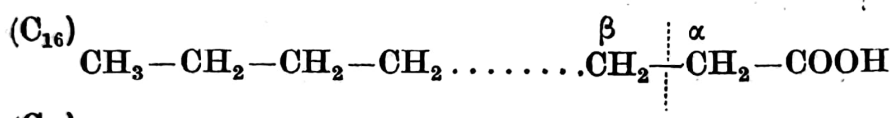
acid acetilacetic

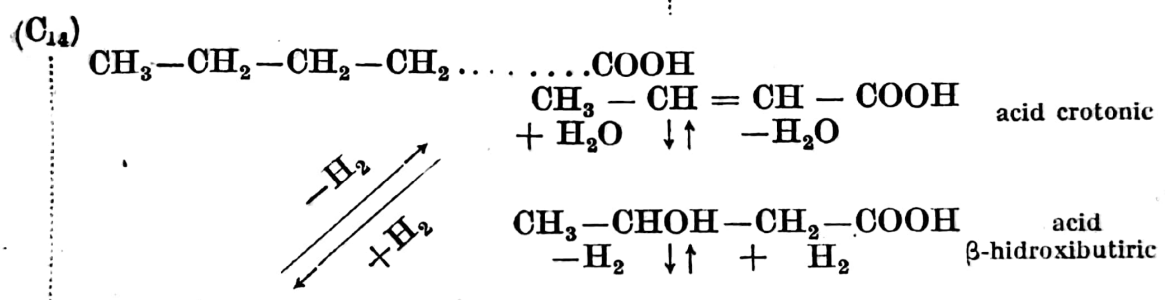
Sau, pornind dela cel mai mic acid gras, acidul butiric, cu 4 atomi de carbon :

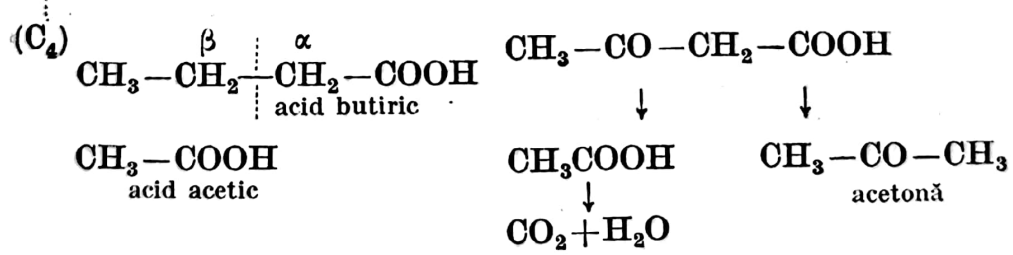


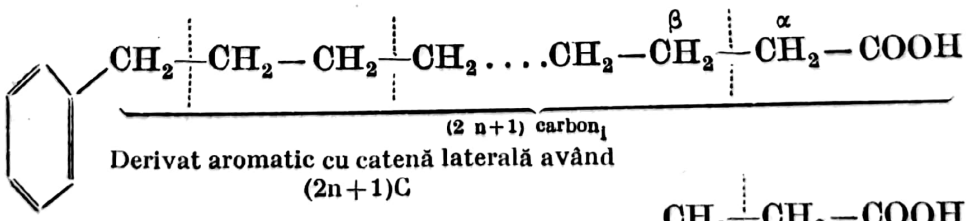
β-oxidarea acizilor graşi



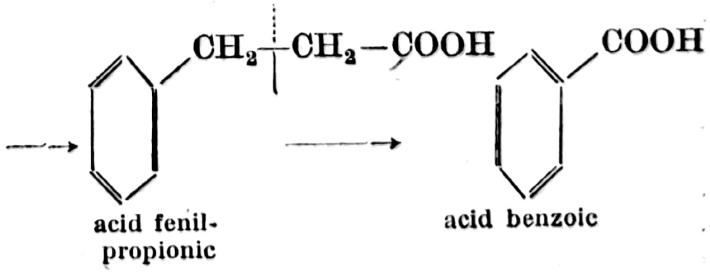


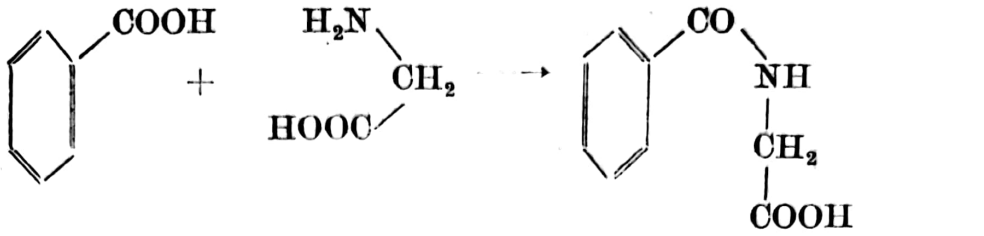




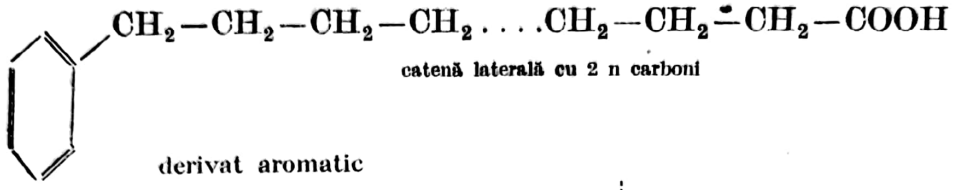


Derivat aromatic cu catenă laterală având (2n+1)C



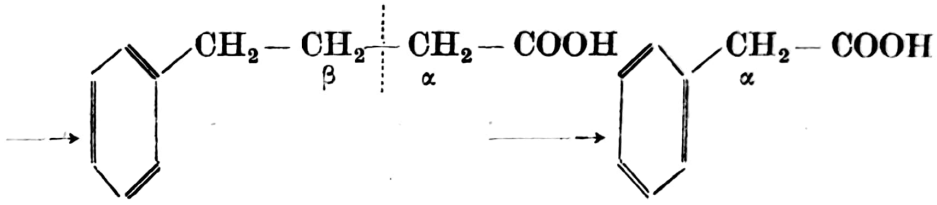


acid benzoic glicocol acid hipuric (acid benzoilglicocol)

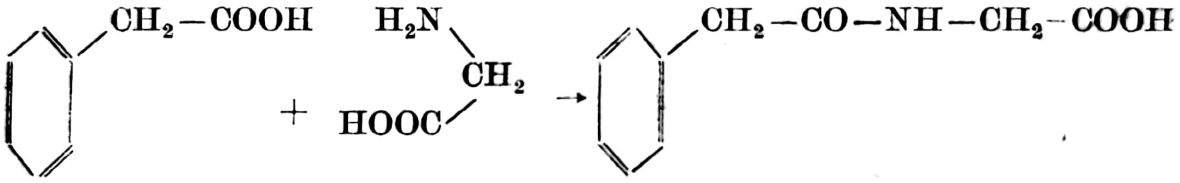


catenă laterală cu 2 n carboni

derivat aromatic



acid fenilbutiric acid fenilacetic



acid fenilacetic glicocol acid fenaceturic
(acid fenilacetilglicocol)

Argumentele experimentale care pledează pentru acest mecanism de degradare sunt următoarele:

1. Acizii graşi naturali având un număr par de atomi de carbon, oxidarea trebue să ducă succesiv la acizi graşi cu câte 2 atomi de carbon mai puţin, dar tot cu un număr par, deci printre aceşti acizi graşi, la un moment dat, trebue să apară şi acela cu 4 atomi de carbon, acidul butiric; aşa dar, dacă se poate pune în evidenţă acest compus, interpretarea mecanismului poate fi justă. Intradevăr, în organismul diabeticilor sau în inaniţie se constată, în condiţii de acidoză, apariţia în urină a aşa zişilor corpi cetonici, acidul acetilacetic, β-hidroxibutiric şi acetona, origina acestor compuşi fiind acidul butiric, rezultat din β-oxidarea acizilor graşi.

Din acid butiric, prin dehidrogenare, rezultă probabil acidul crotonic; din acesta, prin hidratare, acidul β-hidroxibutiric; din acesta, prin dehidrogenare, acidul acetilacetic şi, din acesta, prin decarboxilare, acetona. Prezenţa acestor compuşi indică existenţa intermediară a acidului butiric rămas ca atare şi nedegradat mai departe în cazul diabetului, în inaniţie, în alimentaţia săracă în glucide. Aceşti corpi rezultaţi din acidul butiric nedegradat se acumulează în sânge şi sunt eliminaţi în urină, rezultând aşa numita cetoză, care exprimă incapacitatea ţesuturilor de a degrada acizii graşi prin procesul de β-oxidare dincolo de stadiul de acid gras cu 4 atomi de carbon, acid gras care prin procese de dehidrare, hidratare

și decarboxilare e transformat în așa numiții corpi cetonici care apar în cazul unui metabolism defectuos al glucidelor :

$CH_3-CH_2-CH_2-COOH$ — acid butiric

$-H_2 \downarrow\uparrow +H_2$ ↓

$CH_3-CH=CH-COOH$ — acid crotonic

$+H_2O \downarrow\uparrow -H_2O$ ↓

$CH_3-CHOH-CH_2-COOH$ — acid β–hidroxibutiric

$-H_2 \downarrow\uparrow +H_2$ ↓

$CH_3-CO-CH_2-COOH$ — acid acetilacetic

$\downarrow -CO_2$ ↓

$CH_3-CO-CH_3+CO_2$ — acetonă

Conform acestei teorii, acizii grași cu un număr nepereche de atomi de carbon nu ar trebui să ducă la formarea de acid butiric și nici la corpi cetonici, fapt care este confirmat. Ingestia de acizi grași cu un număr par de carboni duce în organismul diabeticilor la apariția de corpi cetonici, dar nu ingestia de acizi grași cu un număr impar de carboni.

Deasemenea, numai în ficatul perfuzat cu acizi grași cu un număr par de atomi de carbon apar corpi cetonici, pe când în cel perfuzat cu un număr impar nu apar. Primii sunt compuși cetogeni, ceilalți necetogeni.

2. Alt argument în favoarea teoriei β-oxidării este dat de experiențele lui Knoop. El cuplează acizii grași saturați cu un radical benzenic, radical care se știe că nu poate fi metabolizat, deci va fi eliminat, ca atare dar cuplat de data aceasta cu produsul de metabolizare al acidului gras inițial.

Intr'adevăr, dacă se hrănește un animal cu un acid gras cu un număr par (2 n) de C, substituit la ultimul carbon cu un radical fenil, animalul elimină prin urină acidul fenilacetic sub formă conjugată cu glicocolul, acidul fenaceturic (vezi formulele mai sus). Deci, degradarea lanțului carbonic se face prin ruperea succesivă a câte 2 carboni la carbonul β până la acid butiric ; din acesta rezultă acidul fenilacetic, care nu mai are carbon β. Dacă se hrănește animalul cu un acid gras cu (2 n + 1) atomi de carbon cuplat cu radicalul fenil, se elimină prin urină acid benzoic cuplat cu glicocolul sub formă de acid hipuric, deoarece prin β-oxidări succesive nu se ajunge la acidul butiric, ci la acidul propionic care, având încă un carbon, e scindat la acest carbon, compusul rămas fiind acidul benzoic (vezi formulele).

3. Experiențe in vitro făcute cu acizi grași oxidați cu H_2O_2 arată că se pot obține acizi grași prin β-oxidare.

4. Experiențe cu deuterium, respectiv acid stearic (18 C) care conține ^2D în moleculă, arată că în grăsimile de rezervă se depune acidul palmitic (C_{16}) cu ^2D în moleculă, acid cu 2 atomi de carbon mai puțin ca acidul stearic. Deasemenea, experiențe cu ^{13}C au dus la confirmarea acestui mecanism de degradare a acizilor grași. Aproape toți cercetătorii admit

că degradarea curentă a acestor acizi graşi se face printr'o β-oxidare, dar, deoarece s'a constatat că din acizii cu mulţi atomi de carbon (C_8—C_{18}) se obţin proporţional mai mulţi corpi cetonici decât din aceia cu mai puţini atomi de carbon, se admite, după unii autori, că la aceeaşi moleculă de acid gras au loc mai multe oxidări simultane, la mai mulţi atomi de carbon, cu formare de poli — β — cetoacizi instabili care s'ar scinda în mai multe molecule de acid acetilacetic. Aceasta este aşa numita teorie a „*oxidărilor alternante multiple*".

2. **Teoria ω-oxidării acizilor (Verkade).** Verkade, injectând la câine sau la om un triglicerid substituit fie cu acizi graşi saturaţi fie nesaturaţi, ca de exemplu acidul undecilic (cu 11 C) sau capric (cu 10 carboni), constată că se elimină în urină un acid gras cu acelaş număr de atomi de carbon, dar având la ambele capete câte o grupare carboxilică. De exemplu, din acidul undecilic, acidul undecandioic.

$$CH_3—(CH_2)_9—COOH \longrightarrow COOH—(CH_2)_9—COOH$$

acid undecilic — acid undecandioic

Această oxidare constă într'o oxidare a grupării metilice terminale (C ω). El numeşte această eliminare de acizi graşi dicarboxilici, diacidurie.

Această cale de oxidare este însă o cale secundară în organism; preponderentă este β-oxidarea, deoarece diacizii care se elimină în mod obişnuit, în urină reprezintă abia 10% din cantitatea de grăsimi ingerate. Procesul ω-oxidării are loc numai la acizii cu 8, 9, 10 sau 12 carboni. La aceşti acizi are loc o competiţie între ω şi β-oxidare.

Se crede că acizii cu mai mult de 18 carboni ar suferi întâi o scurtare a lanţului prin β-oxidare, apoi o ω-oxidare şi în urmă o nouă β-oxidare alternantă.

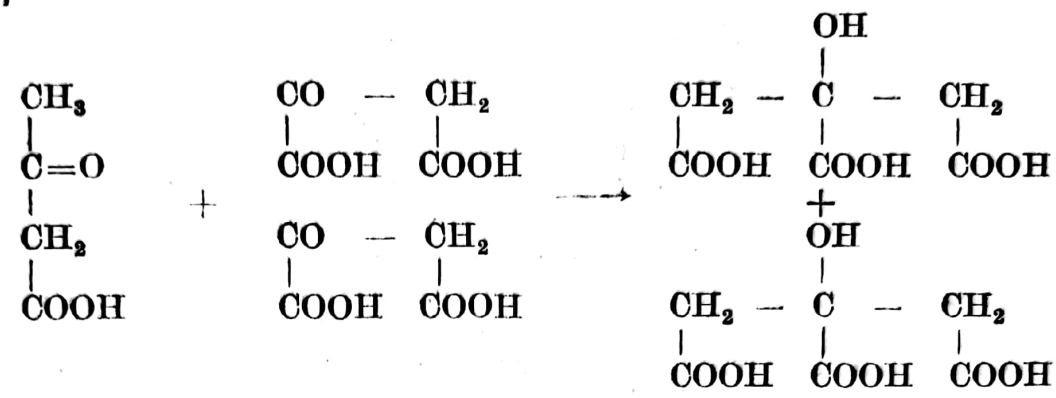
Metabolismul acidului acetilacetic

Ciclul izocitric în metabolismul acizilor graşi. Teoria β-oxidării simple sau alternante admite scurtarea succesivă a lanţului de atomi de carbon al acidului gras până la acidul gras cu cea mai scurtă catenă, acidul acetic, din care rezultă acidul β-cetonic, acidul acetilacetic. Nu se ştie exact mecanismul prin care acidul acetic se condensează pentru a forma acetoacetatul.

Se crede că ar avea loc o formare de acetilfosfat conţinând o legătură fosfat puternic energetică $CH_3.CO.\sim —(P)$, care se condensează uşor cu acidul acetic. Dovada formării acidului acetilacetic a fost făcută cu ^{13}C.

Problema care se pune este acum aceea a transformării ulterioare a acestui compus până la produsele finale CO_2 şi H_2O, deoarece în organism acidul acetic nu e metabolizat cu o viteză suficientă şi nici nu s'a reuşit să se demonstreze existenţa unei enzime specifice, a unei acid aceticanhidraze, care să catalizeze această transformare. Breusch a reuşit să arate calea de oxidare a acestui compus cu 2 atomi de carbon. Descoperirea unei alte enzime, numită de Breusch citrogenoză, l-a făcut să admită că în prezenţa acesteia acidul acetilacetic şi β-cetoacizii în general

pot reacţiona cu acidul oxaloacetic cu formare de acid citric, conform reacţiei :



acid acetilacetic — 2 mol. de acid oxaloacetic — 2 mol. de acid citric

Nu se ştie cu precizie dacă se formează produse intermediare şi care sunt acestea ; nici nu se ştie cu precizie dacă se formează întâi acid citric sau izocitric sau aconitic. Produsele acestea am văzut că rezultă şi din degradarea aerobă a glucidelor şi pot fi degradate pe aceeaşi cale a ciclului izocitric (Krebs). Acest rol al ciclului lui Krebs a fost confirmat cu ajutorul acidului acetilacetic conţinând C izotop. Există astfel o competiţie între glucide şi lipide pentru acidul oxaloacetic şi vom vedea că în acest punct există o legătură între metabolismul glucidelor şi lipidelor : dacă are loc o deficienţă în metabolismul glucidelor, se produce o scădere în formarea acidului piruvic, deci o formare redusă de acid oxaloacetic (care rezultă din acidul piruvic prin fixare de CO_2). Condensarea cu acizii cetonici rezultaţi din β-oxidarea acizilor nu se mai produce, ceeace duce la apariţia de corpi cetonici în catabolismul acizilor graşi şi al glucidelor.

Metabolismul corpilor cetonici

Cetogeneza-anticetogeneza. Am văzut că, în degradarea acizilor graşi, corpii cetonici (respectiv acidul β-hidroxibutiric, acidul acetilacetic) apar ca o etapă intermediară şi se crede că ar fi o etapă intermediară obligatorie. Acidul acetilacetic şi β-hidroxibutiric se pot transforma unul într'altul prin acţiunea catalitică a dehidrogenazei β-hidroxibutirice împreună cu coenzima I, ambele foarte răspândite în ţesuturile animale. Degradarea acizilor graşi până la această etapă are loc în ficat ; degradarea mai departe a corpilor cetonici are loc în rinichi şi în special în muşchi. Intr'adevăr, dacă se perfuzează ficatul cu o soluţie de acid acetilacetic, se stabileşte în lichidul aferent un echilibru între acidul acetilacetic şi acidul β-hidroxibutiric. Acidul acetilacetic nu dispare, ficatul putând face numai transformarea reversibilă : acid β-hidroxibutiric $\rightleftarrows$ acid acetilacetic şi nu oxidarea mai departe a acidului acetilacetic. Dacă se perfuzează însă rinichiul sau o regiune musculară cu acid acetilacetic, acesta dispare. Oricare ar fi locul de degradare a corpilor cetonici, organismul normal degradează imediat aceste produse dăunătoare (fiind toxice şi ca atare, şi prin crearea unei acidoze marcate). In organismul diabeticilor, în cazul unei inaniţii glucidice, în cazul unei intoxicări a enzimelor care intervin în catabolismul glucidelor, corpii cetonici nu pot fi degradaţi

şi trec ca atare în circulaţia sanguină şi în urină. Deci, apariţia de corpi cetonici are loc în cazul unui aport insuficient de glucide, sau al unei degradări viciate a lor, adică în împrejurări care duc la o deficienţă în depozitare de glicogen. Corelaţia dintre degradarea complectă a acizilor graşi şi degradarea glucidelor poate fi explicată prin interpretarea lui Breusch, şi anume, prin intervenţia acidului oxaloacetic. O incomplectă formare de acid oxaloacetic necesar oxidării corpilor cetonici pe calea ciclului acizilor tricarboxilici duce la acumularea acestor corpi cetonici ca atare. Se ştie că acidul oxaloacetic este format din acidul piruvic prin carboxilare şi derivă din glucide; o lipsă de glucide în organism duce la o incomplectă formare de acid oxaloacetic. Fraza celebră a lui Hirschfeld că „grăsimile ard la focul glucidelor" apare astfel ca justificată şi interpretarea lui Breusch explică acţiunea anticetogenă a glucidelor.

In general au *acţiune anticetogenă* numai acele substanţe care pot procura acidul oxaloacetic sau acidul piruvic, precursorul său, şi anume: glucoza, acidul lactic şi o serie de aminoacizi, ca de exemplu alanina. Acidul oxaloacetic apare astfel ca o substanţă cheie în metabolismul lipidelor şi acela al glucidelor şi stabileşte interrelaţia între aceste două metabolisme pe calea ciclului izocitric, pe calea ciclului acizilor tricarboxilici.

Ficatul este organul principal al metabolismului grăsimilor. El iniţiază degradarea acizilor graşi, prin β-oxidare în special, până la formare de acid acetoacetic şi acid β-hidroxibutiric; niciun alt organ nu e capabil să realizeze β-oxidarea alternantă. Degradarea ulterioară nu o poate face însă ficatul, acidul acetilacetic şi acidul β-hidroxibutiric fiind produsele finale ale catabolismului acizilor graşi în ficat. Oxidarea finală are loc prin ciclul acizilor tricarboxilici în muşchi şi rinichi, care conţin mari cantităţi de citrogenază, pe când ficatul conţine numai mici cantităţi din această enzimă, care catalizează condensarea acidului oxaloacetic cu acidul acetilacetic.

Metabolismul corpilor cetonici este sub dependenţa *hormonilor* care intervin în metabolismul glucidelor. Insulina ar fi aceea care, efectiv, previne formarea corpilor cetonici, atribuindu-se un rol în transformarea glucozei sanguine în glucozofosfatul din muşchi (hexokinaza), reacţie necesară pentru formarea acidului piruvic din glucoză şi deci a acidului oxaloacetic. Adrenalina ar avea rolul să prevină eliminarea corpilor cetonici din sânge. Hormonul diabetogen din hipofiză ar avea şi el un control în acest mecanism.

Printre *enzimele* care participă la metabolismul acizilor graşi ar fi şi codehidrazele I şi II. Se pare că metabolismul acizilor graşi, ca şi acela al glucidelor, implică intervenţia radicalilor fosforici şi se poate ca degradarea oxidativă a acizilor graşi să ducă la crearea unor legături puternic energetice.

Oxidarea terminală comună a acizilor graşi, glucidelor şi aminoacizilor

Acidul oxaloacetic reprezintă un punct comun în ciclul de degradare a acizilor graşi, glucidelor şi aminoacizilor, deoarece acidul oxaloacetic e un intermediar comun care lucrează ca transportor de hidrogen între carbohidraţi şi oxigen. Rolul acidului oxaloacetic (din ciclul acizilor dicarboxilici în C_4) ca transportor de hidrogen a fost neglijat de majoritatea cercetătorilor din cauză că enzima corespunzătoare pierde jumătate din

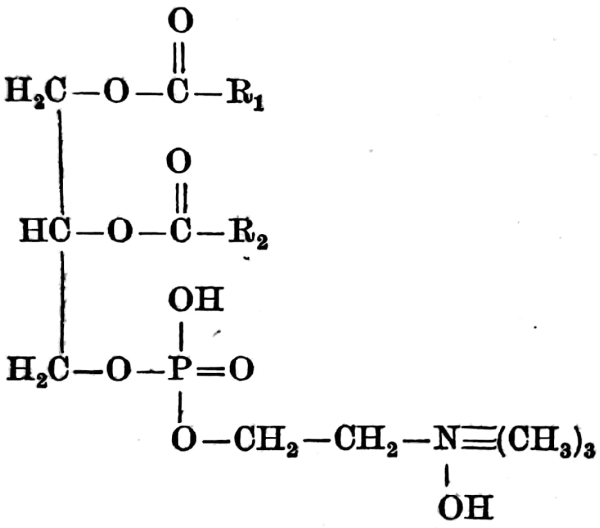
Scanned with OKEN Scanner

activitatea sa în 30' după moartea animalului de experienţă. Acidul oxaloacetic este principala substanţă necesară, atât arderii glucidelor, cât şi grăsimilor. Acidul piruvic şi acidul oxaloacetic rezultaţi în procesul de transaminare pot stabili deasemenea relaţii între metabolismele celor trei compuşi chimici de bază, glucide, lipide, protide.

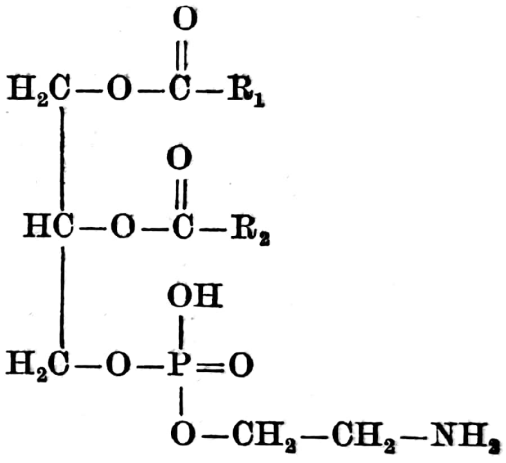
METABOLISMUL FOSFATIDELOR

Fosfatidele sunt componente esenţiale ale lipidelor protoplasmatice. Sunt, ca şi proteinele, constituenţi protoplasmatici cu rol funcţional şi nu numai sursă de energie calorică. Se consideră conţinutul în fosfolipide al unui organ ca un index al activităţii lui. Conţinutul în fosfatide creşte cu acţiunea fiziologică.

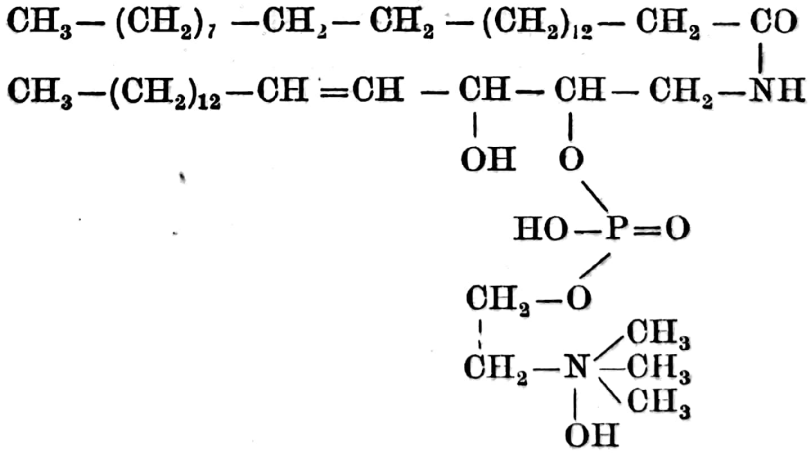
Cele mai cunoscute lipide sunt *lecitina*, *cefalina* şi diaminofosfatidul *sfingomielina* :



lecitină



cefalină



sfingomielină

Se găsesc în toate celulele; în creier predomină cefalina (20,42%) (vezi tabelul 25).

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 25

Conținutul în lecitină, cefalină și sfingomielină ale diverselor organe la om

Valori exprimate în mg % mg organ uscat

Organe	Lecitine	Cefaline	Sfingomieline
Creier	4,81	20,42	5,66
Plămân	3,85	2,00	1,45
Splină	3,54	4,16	0,86
Rinichi	5,10	3,26	0,72
Ficat	4,81	4,62	0,38
Inimă	4,47	2,06	0,34

O parte din fosfatidele aduse cu alimentația trec nescindate prin peretele intestinal, iar o parte sunt scindate în componentele lor, acid fosforic, bază azotată și acizi grași, fiecare din aceste componente eliminându-se după căile sale proprii de degradare.

Colina sau colamina se elimină probabil sub formă de uree. Colina, având însă un rol funcțional fundamental, este menținută ca atare în organism și numai în mică măsură catabolizată. In unele organe lecitina este chiar, o formă de depozitare a colinei. Are acțiune lipotropă. Colina are un rol important în depozitarea și transportul grăsimilor în organism. Metionina are acțiune lipotropică prin transferul grupei sale metilice pe colamină, ceeace duce la formare de colină. Aceeași acțiune o are și betaina. In absența factorilor lipotropi are loc o acumulare în ficat. Colina împiedică depunerea grăsimilor în ficat prin combinarea ei cu radicalul fosforic al lecitinelor și transformă astfel acizii grași insolubili în fosfatide solubile. Fosfolipidele iau naștere prin fosforilare din acizii grași chiar în peretele intestinal, făcând astfel posibilă pătrunderea și transportul acestor acizi grași pe cale sanguină. Ele intervin astfel în absorbția și transportul acizilor grași în organism. Degradarea fosfatidelor se face în special în rinichi și ficat, dar aproape toate organele pot degrada fosfatidele. Nu fiecare organ le degradează însă la fel; de exemplu, pancreasul degradează din lecitină numai un acid gras, suprarenala doi acizi grași.

Experiențe făcute cu ^{32}P au arătat că în organism fosfatidele se pot degrada și sintetiza continuu, sub acțiunea specifică a fosfatazelor. O oră după injecția de fosfat disodic conținând ^{32}P se constată în organele șoarecelui fosfatide conținând ^{32}P. Folosind ^{32}P și deuterium încorporat în moleculele acidului gras s'a constatat că acidul fosforic și acidul gras sunt cel mai repede transformați în mucoasa intestinală, mai lent în ficat și cel mai lent în țesutul muscular și rinichi.

Există o formare endogenă de fosfatide chiar după o alimentație lipsită de grăsimi. Aceste fosfatide au o compoziție absolut constantă pentru fiecare țesut. Creierul ar avea capacitatea de a sintetiza fosfolipide.

In creier, încorporarea ^{32}P este un proces lent, deasemenea desfacerea acestuia. Transformarea cefalinelor și sfingomielinelor este mai rapidă decât a lecitinelor. Incorporarea ^{32}P în fosfolipidele din globulul roșu este mai lentă decât în plasmă.

Fosfatidele au un rol foarte important în organism. Au rol în absorbția și vehicularea grăsimilor, în degradarea oxidativă. Se găsesc în special

în ficat, intestin, plasmă şi în genere în ţesuturile în care au loc schimburile de lipoide: mucoasa intestinală, unde se face absorbţia grăsimilor, ficatul, unde sunt degradate, plasma sanguină, prin intermediul căreia se face transportul lor. Prin tendinţa lor de a se acumula la suprafaţa celulelor, au acţiune asupra membranei celulare. Prin colină, fosfatidele controlează motilitatea musculară, prin radicalul fosforic intervin în metabolismul nucleoproteidelor, glucidelor, etc. Se crede că cefalinele din creier nu ar avea o structură unitară, unele ar conţine aminoacidul serina, altele inozitol.

Cerebrozidele sunt glicolipide care conţin în moleculă sfingozină, galactoză şi acizi graşi; intră în special în structura substanţei nervoase şi mai ales în substanţa albă. Au un metabolism intermediar analog cu al lecitinelor.

METABOLISMUL STERIDELOR

Steridele sunt esteri ai acizilor graşi cu colesterolul. Degradarea acizilor graşi se face după schema deja expusă, astfel că degradarea steridelor se reduce la aceea a sterolilor. Sterolul cel mai important din organismul animal este colesterolul.

Coprosterolul nu este o componentă celulară, ci un produs de eliminare care derivă din colesterol prin reducere, sub acţiunea florei microbiene intestinale. In intestin, colesterolul e în parte absorbit, în parte eliminat sub formă de coprosterol.

Absorbţia colesterolului

Colesterolul adus cu alimentaţia (precum şi ceilalţi steroli şi vitamine D) este absorbit la nivelul intestinului în prezenţa acizilor graşi şi a acizilor biliari care îl solubilizează.

Esterii de colesterol sunt hidrolizaţi de enzimele din sucul pancreatic şi intestin. Aceşti esteri sunt resintetizaţi; absorbţia se face probabil sub formă de esteri ai colesterolului cu acizii graşi, rezultaţi sub acţiunea *colesterazei pancreatice*. Sărurile biliare activează această absorbţie. Sterolii vegetali nu sunt absorbiţi în intestin şi se elimină ca atare prin fecale. Acest fapt indică o mare specificitate chimică a diverşilor steroli în raport cu capacitatea lor de a fi absorbiţi sau nu; variaţii mici ale configuraţiei condiţionează astfel posibilitatea lor de asimilare.

Origina colesterolului

In organism este dublă: e x o g e n ă, din colesterolul adus cu alimentaţi şi e n d o g e n ă, prin sinteză. Sinteza endogenă are loc în special în ficat. Animalele hrănite cu o alimentaţie complect lipsită de colesterol au totuşi colesterol. Deasemenea, cu ajutorul ^{13}C s'a dovedit posibilitatea de sinteză a acestuia în organism. Experienţe cu deuterium ^{2}D au dovedit deasemenea capacitatea organismului de a sintetiza colesterol din molecule mai mici ce conţineau deuterium, de exemplu, din acid acetic. Se pare că jumătate din atomii de C din molecula colesterolului derivă din acidul acetic. Se crede că o mare parte din colesterolul sintetizat ar proveni din acizii graşi, şi anume, din acidul oleic. Origina endogenă a colesterolului

este sub dependența secreției unor glande endocrine: suprarenală, ovar, splină.

Colesterolul se găsește în organism sub două forme: liberă și sub formă de esteri ai acizilor grași. In globulul roșu se găsește aproape total sub formă liberă, în plasmă în special sub formă de esteri, în bilă sub ambele forme. Colesterolul insolubil în apă este solubil în bilă, dar sub formă instabilă, ceeace duce la precipitarea acestuia cu formare de calculi de colesterol în vezicula biliară. Excreția colesterolului se face prin bilă, care este astfel calea de eliminare. Cantitatea excretată zilnic este de 0,48—1,60 g. Colesterolul deversat în duoden de către bilă este resorbit din nou în intestinul subțire, o parte trece în sânge și o altă parte în intestinul gros unde, sub acțiunea bacteriilor intestinale, este transformat prin dehidrogenare la C_5 în coprosterol și eliminat prin fecale.

Colesterolul și esterii lui sunt insolubili în apă și solubili în grăsimi neutre și acizi biliari.

Colesterolul este o substanță antilipotropă, favorizează depunerea de grăsimi în ficat. Importanța fiziologică a colesterolului este și în legătură cu participarea lui la formarea membranelor celulare. Are probabil rol în desintoxicarea substanțelor străine din organism (înlătură acțiunea hemolitică a veninului șerpilor). Are rol în procesele de apărare împotriva infecțiilor (se crede că datorită combinației cu γ-globulina din sânge).

Vitamina A ar avea o acțiune de reglare a metabolismului colesterolului. Lipsa vitaminei A scade colesterolul sanguin; excesul de vitamină A îl mărește. *Vitamina E* deasemenea ar interveni în metabolismul colesterolului.

Colesterolul sanguin variază la normali între 1,50—2 g $^0/_{00}$ cc ser.

Variațiile patologice ale colesterolului sanguin sunt legate de acelea ale colesterolului din plasmă; cel din globule e mult mai constant.

Hipocolesterolemia se observă în cursul infecțiilor grave cu scăderi la 1,10—1,20 g $^0/_{00}$; vindecarea e caracterizată printr'o hipercolesterolemie compensatoare.

Hipercolesterolemia se constată într'un mare număr de boli, în azotemii cronice corespunzătoare unei azotemii scăzute ca un efect de compensare, în diabetul zaharat, în icterele prin retenție, în ciroze hepatice. Ficatul are un rol important în sinteza esterilor de colesterol, căci ori de câte ori are loc o alterare a celulelor hepatice se constată o scădere a acestora în sânge.

Metabolismul acizilor biliari

Acizii biliari sunt eliberați exclusiv de celulele hepatice ale vertebratelor. Acești compuși sunt *acidul glicocolic* și *acidul taurocolic* (fig. 106). In bilă se găsește în cantitate mică și *acidul litocolic*. In sânge se găsesc numai primii doi acizi biliari și în cantități foarte mici, mai puțin de 0,1 mg%. In icterul mecanic sunt valori crescute, în icterul parenchimatos valori scăzute. In bilă se elimină zilnic 2,6—18,2 g acizi biliari, în special acid glicocolic.

Organismul poate sintetiza acizii biliari; în experiențele pe animal s'a observat că se elimină în bilă mai mulți acizi biliari decât steroli ingerați, deci organismul animal are capacitatea de a sintetiza acizi biliari și din alte substanțe. Sinteza acizilor biliari se face în ficat, deci acest

organ este locul de formare şi de degradare a acizilor biliari. Acest lucru reiese din experienţele făcute pe animalele cărora li s'a extirpat ficatul. Acidul colic este format în ficat din colesterol, aşa cum s'a dovedit cu ajutorul deuteriumului.

Din totalitatea acizilor biliari separaţi în intestin două treimi sunt din nou resorbite, restul e eliminat prin fecale, unde gruparea aminică e desfăcută sub acţiunea bacteriilor.

Importanţa biologică a acizilor biliari constă în rolul pe care l-am văzut că-l au în digestia grăsimilor, în absorbţia colesterolului şi chiar a vitaminei D (se crede că tot prin formare de acizi coleinici).

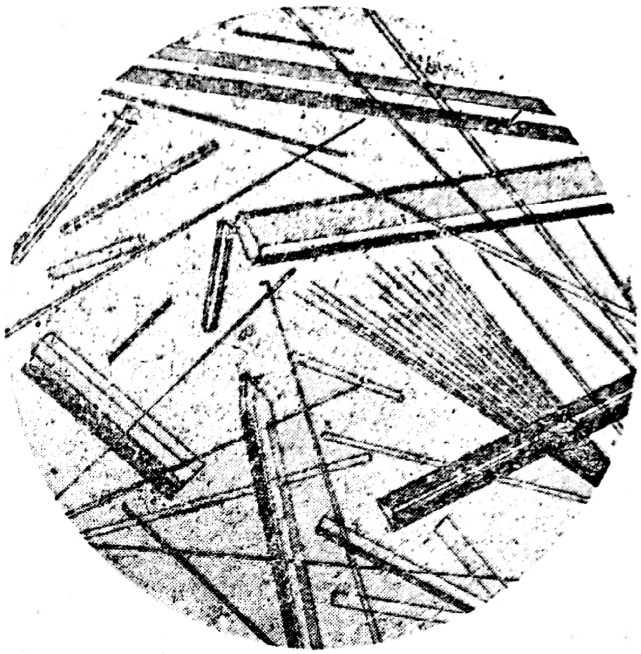


Fig. 106. Săruri biliare.

Ciclul entero-hepatic al acizilor biliari

Acizii coleinici rezultaţi din cuplare cu acizi graşi sau cu alte substanţe sunt scindaţi din nou în mucoasa intestinală în acizi biliari liberi şi radicalul cu care au fost constituiţi (de exemplu acizi graşi). Acizii biliari sunt duşi la ficat, reţinuţi în acest organ, şi eliminaţi din nou în bilă, de unde sunt din nou recuperaţi. Prin acest circuit „entero-hepatic", cea mai mare parte a acizilor biliari eliminaţi iniţial în bilă sunt păstraţi în organism, ceeace realizează o economie importantă de substanţe cu nucleu sterolic. Dacă se administrează bilă sau acizi biliari pe cale orală, ei apar în sânge, sunt reţinuţi în ficat şi apoi eliminaţi în bilă de unde pot fi recuperaţi în scurt timp; 80—90% din acizii biliari ingeraţi pot fi găsiţi în bila animalelor cu fistulă biliară.

Dacă prin obstrucţia căilor biliare sau în ictere grave nu se revarsă bilă în intestin, deci nici acizi biliari, grăsimile neutre nu pot fi hidrolizate şi se elimină ca atare în fecale (aceasta constitue chiar un mijloc de diagnostic). Acizii biliari stimulează intens secreţia bilei, secreţia renală, eliminarea clorului. Au o influenţă netă asupra metabolismului glucidelor, asupra formării de glicogen în ficat, în oxidările celulare.

Analogia structurală chimică a acizilor biliari cu colesterolul a făcut să se creadă la un moment dat că acesta este substanţa mamă a acizilor biliari în organism. Experienţe cu hidrogen greu au dovedit acest lucru, deşi hrănirea animalelor cu colesterol nu a dus la o creştere a acizilor biliari. Este probabil însă că, atât colesterolul, cât şi acizii biliari, derivă din aceleaşi substanţe care, la un moment dat, se diferenţiază aşa fel încât rezultă sau acizi biliari sau colesterol (derivând, ca şi hormonii sexuali, corticosuprarenali, vitamina D, din aceeaşi substanţă de bază, scalenul sau, în ultimă instanţă, din lanţul triatomic de carbon).

Scanned with OKEN Scanner

METABOLISMUL CAROTENOIDELOR

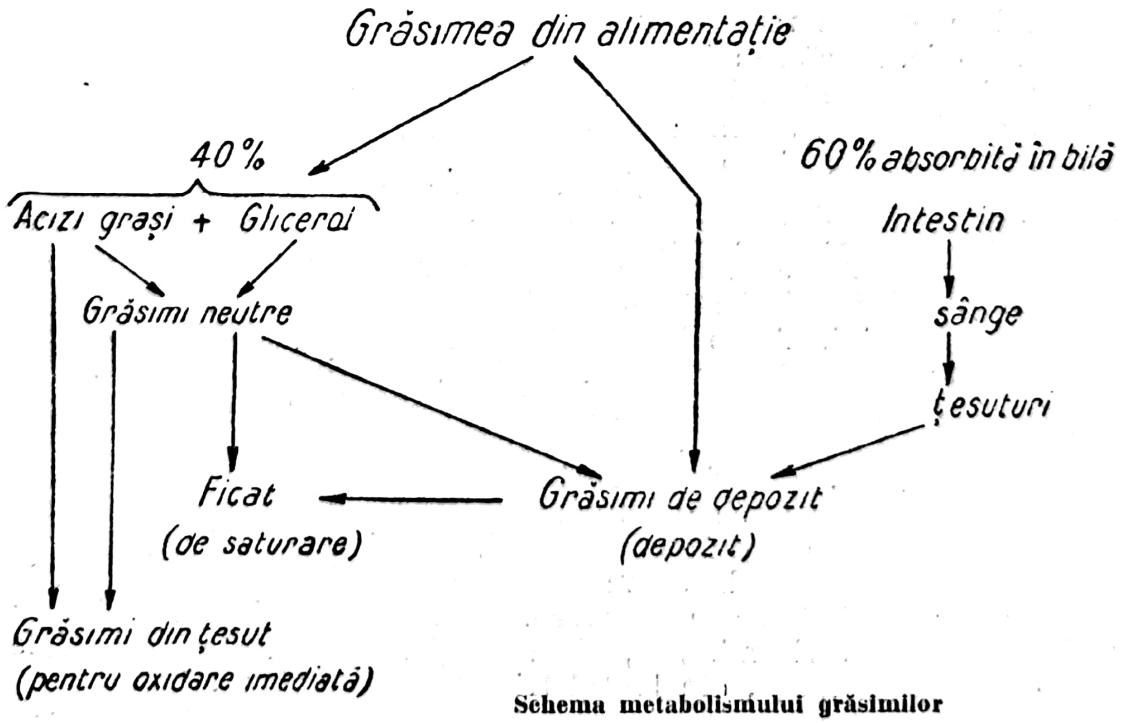
Am văzut la capitolul despre vitamina A structura chimică a carotenoidelor şi relaţia lor cu vitamina A.

Origina carotenoidelor este vegetală. In organismul animal, vitamina A se găseşte în cantităţi mari, dar introdusă prin alimentaţie. Se găsesc carotenoide în grăsimi, în lapte, corp galben, suprarenală, ser, hipofiză, retină, gălbenuşul oului de găină. Dacă se alimentează găinile fără substanţe carotenoide, gălbenuşul rămâne aproape incolor.

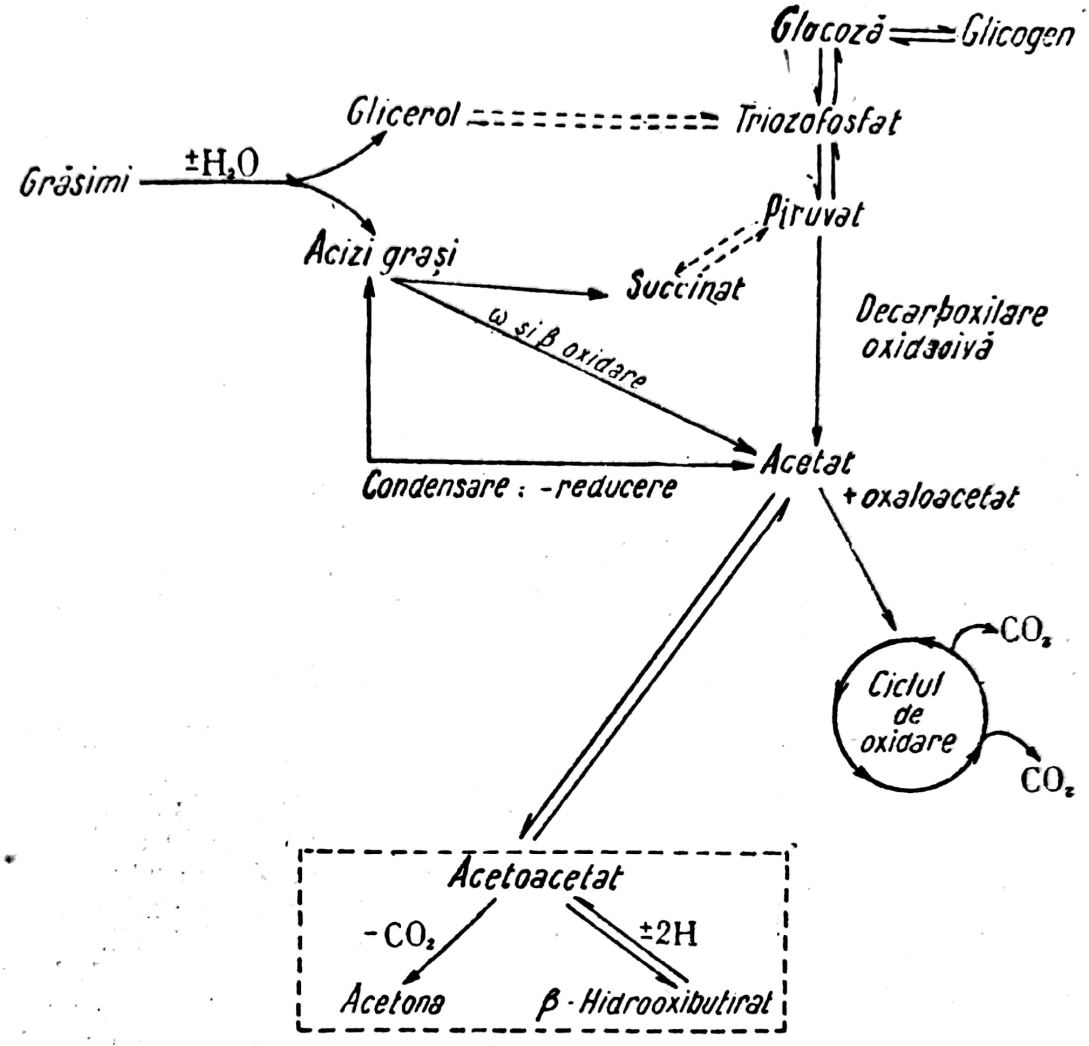
Carotenul la plante constitue un factor de creştere. Se găseşte într'adevăr în cantităţi mari în timpul creşterii plantei. In organismul animal are un rol important prin relaţia pe care o are cu vitamina A: este provitamina vitaminei A.

Ficatul depozitează şi transformă carotenul în vitamină A şi depozitează în acelaş timp şi vitamina A ca atare; de aici e transmisă celorlalte organe. Transformarea carotenului în vitamina A se face sub acţiunea carotenazei, activitatea acestui ferment fiind condiţionată de prezenţa tiroxinei. Transformarea carotenului în vitamină A este în funcţie nu atât de cantitatea de caroten, ci de nevoia organismului de vitamină A. In anumite afecţiuni, ficatul nu poate transforma carotenul în vitamină A, dar poate utiliza vitamina A ca atare.

După o alimentaţie foarte bogată în caroten, pigmentul galben se localizează în piele şi mucoase şi îngălbenirea acestora se deosebeşte de icter prin dispunerea pigmentării pe tălpi, interiorul palmelor. Această retenţie de caroten se explică printr'o modificare în capacitatea de absorbţie a carotenoidelor. Absorbţia carotenelor în intestin are loc numai în prezenţa grăsimilor neutre. Cum multe alterări ale funcţiei ficatului sunt paralele cu deranjări în absorbţia grăsimilor, aceasta poate explica dece şi absorbţia de caroten scade; acest lucru are drept consecinţă şi o lipsă de vitamină A.



Schema metabolismului grăsimilor



Metabolismul grăsimilor

METABOLISMUL PROTEINELOR

Rolul proteinelor în organism este multiplu. Ele au: 1) *rol plastic* (creşterea şi refacerea ţesuturilor degradate prin uzură), 2) *rol energetic*, 3) *rol fizico-chimic*, datorită structurii lor coloidale, intervenind astfel într'o serie de procese de reglare fizico-chimică (reglarea echilibrului acido-bazic), reglarea presiunii oncotice şi osmotice, reglarea la limitele de faze, echilibrul Donnan, etc.).

Proteinele din alimentaţie, sub acţiunea enzimelor digestive specifice din stomac şi intestin, sunt scindate hidrolitic până la acizi aminaţi. Acizii aminaţi sunt absorbiţi la nivelul mucoasei intestinale. Prin peretele intestinal trec în vena portă şi de aici în ficat; o parte din acizii aminaţi sunt degradaţi mai departe, iar o altă parte sunt trecuţi ca atare, prin intermediul sângelui, diverselor organe. In organe, acizii aminaţi sunt reţinuţi mai întâi ca atare şi ulterior transformaţi în proteine proprii fiecărui ţesut, constituind proteinele tisulare.

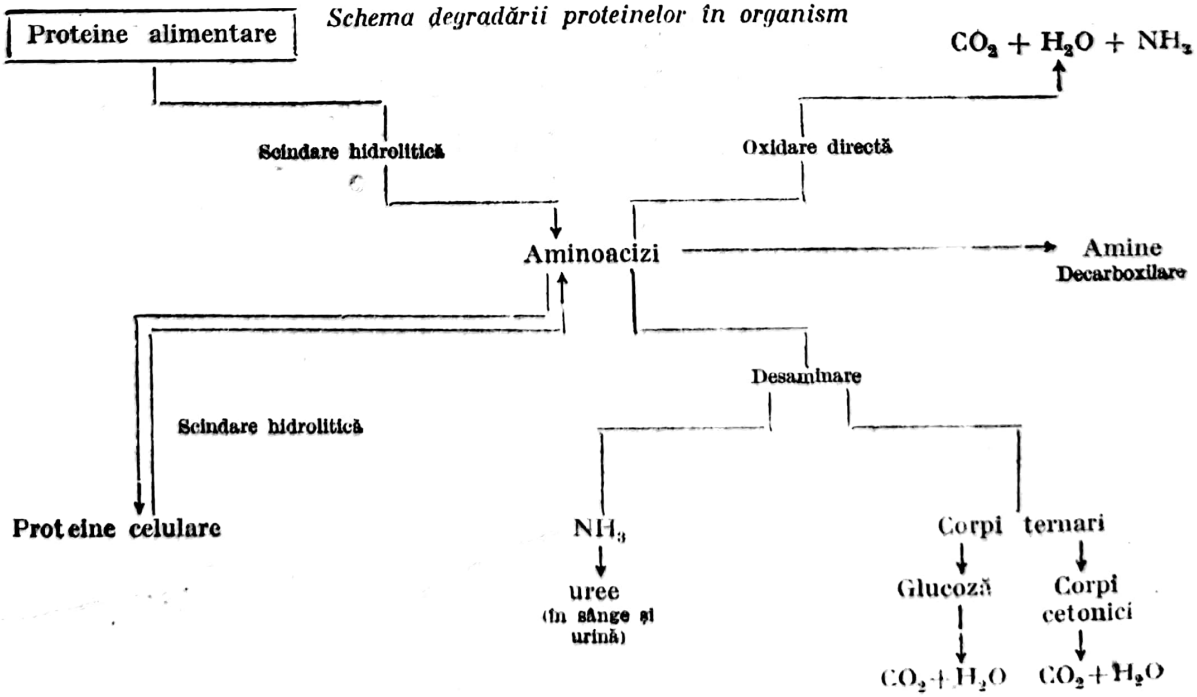
In condiţii normale nu trec în sânge decât cantităţi infime de proteine, mai ales peptone şi polipeptide. Ţesuturile nu sunt capabile să folosească produsele de degradare ale proteinelor mai complexe decât

aminoacizii. Deci, hidroliza digestivă a proteinelor alimentare prepară componentele necesare reconstrucţiei proteinelor specifice fiecărui organism, respectiv fiecărui organ. Aceste proteine sunt sintetizate chiar în organul respectiv, afară de fibrină, care este sintetizată în ficat. Fiecare ţesut la rândul său poate degrada proteinele proprii graţie unui sistem enzimatic şi probabil în acelaş mod ca şi degradarea hidrolitică a proteinelor alimentare în aparatul digestiv. Această degradare are loc pe măsura necesităţilor proprii. Pentru proteine nu există un depozit central şi nici o depozitare în vreun organ special, cum este cazul pentru glicogen (ficatul) sau pentru lipide (ţesutul adipos). Dacă există un aport excesiv de proteine prin alimentaţie, nu se face o depozitare decât în foarte mică măsură. Spre deosebire de glucide şi lipide, unde aportul excesiv duce la o depozitare a acestora în organism, pentru proteine, cu cât aportul e mai mare, cu atât şi degradarea lor e mai intensă. Există un echilibru între azotul introdus cu proteinele alimentare şi produsele lor de eliminare prin urină. Invers, organismul e capabil să-şi sintetizeze proteinele necesare din înseşi produsele de degradare ale acizilor aminaţi. Acest lucru constituie aşa numitul *echilibru azotat* al organismului, echilibru a cărui explicaţie o expunem mai jos. Pentru formarea proteinelor corpului în creştere, animalul tânăr trebue să aibă un bilanţ azotat pozitiv, adică aportul exterior de azot să întreacă eliminarea.

Cantitatea de proteine necesară pentru a atinge acest echilibru măsoară necesitatea proteinică minimă a individului. După Rubner, necesitatea proteinică minimă ar fi în medie de 100—200 g proteine pe zi ; dar, desigur, aceasta depinde şi de natura proteinei, de componenţa ei în aminoacizii esenţiali. Astfel, proteinele animale îndeplinesc mai bine aceste condiţii, una din funcţiile de bază ale proteinelor fiind procurarea aminoacizilor necesari substanţelor structurale şi funcţionale ale celulei vii.

Azotul din proteine, respectiv din acizii aminaţi, se elimină sub formă de amoniac, iar amoniacul este desintoxicat în ficat la mamifere cu formare de uree, care se elimină prin urină, la păsări şi reptile cu rezultat acid uric. Putem da, înainte de a intra în detaliile fiecărui mecanism în parte, următoarea schemă rezumativă a degradării proteinelor în organism :

Schema degradării proteinelor în organism



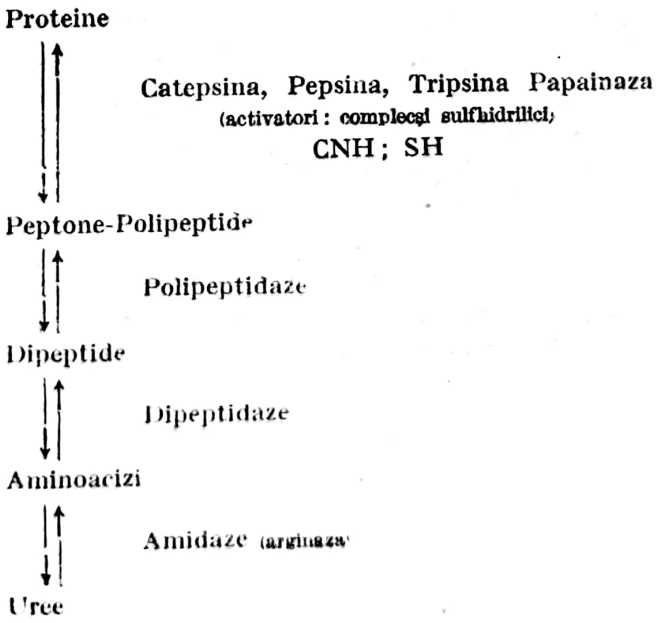
Scanned with OKEN Scanner

DIGESTIA PROTEINELOR

Saliva nu ar conţine enzime proteolitice. Digestia proteinelor alimentare începe în stomac sub acţiunea *pepsinei*, enzimă proteolitică care acţionează la pH = 1,5 — 2. Aproape toate proteinele sunt atacate de pepsină. Produsele rezultate sunt proteoze şi peptone, adică polipeptide cu greutate moleculară încă mare, dar, care, spre deosebire de proteine, sunt solubile; sucul stomacal are deci un prim rol de a transforma proteinele insolubile în produse solubile. Acţiunea pepsinei este mai intensă asupra proteinelor native. Dedublarea acestor produse cu moleculă mare se continuă în intestinul subţire. Digestia gastrică prepară substanţele pentru acţiunea sucului pancreatic şi intestinal. Ele conţin un sistem fermentativ complex care desăvârşeşte dedublarea mai departe a acestor proteoze şi peptone în polipeptide, dipeptide, şi în fine, acizi aminaţi, ultimele produse de dedublare ale scindării hidrolitice a proteinelor.

Sucul pancreatic conţine un complex enzimatic format din *proteine triptice*, *protaminaze şi carboxipolipeptidaze*, care corespunde la ceeace se înţelegea înainte sub numele de *tripsină* (se credea că e vorba de o singură enzimă proteolitică). Sucul pancreatic ca atare e inactiv; el devine activ numai sub acţiunea unui activator fiziologic secretat de mucoasa intestinală care se găseşte în sucul intestinal, *enterokinaza*. Toate enzimele pancreatice scindează legăturile peptidice până la dipeptide. Degradarea mai departe a acestor dipeptide se face de către enzimele sucului intestinal, care sunt de altfel capabile de a scinda şi polipeptidele şi dipeptidele. Sucul intestinal complectează aşa dar acţiunea sucului pancreatic. Sucul intestinal conţine şi el un complex enzimatic format din *aminopolipeptidaze*, *dipeptidaze*, *polipeptidaze*, constituind ceeace se credea înainte că este o singură enzimă, *erepsina*. Intervenţia sucului intestinal duce la formare de acizi aminaţi. Aminoacizii sunt absorbiţi ca atare în curentul sanguin portal şi cedaţi, pe calea ficatului, circulaţiei generale. Intr'adevăr, în timpul absorbţiei, concentraţia aminoacizilor liberi în sânge creşte.

Proteoliza



Travaliul digestiv constă deci într'o dislocare a moleculei mari de proteină, în componentele sale ultime, acizii aminați. Grație acestei dislocări se produc o serie de fenomene.

1. Se poate face absorbția proteinelor sub formă de acizi aminați prin peretele intestinal.

2. Organismul poate selecționa din diversitatea acizilor aminați care intră în compoziția proteinelor alimentare pe cei utili necesităților fiziologice, și anume, acizii necesari creșterii și reparației țesuturilor, sintezei proteinelor proprii, a diverșilor hormoni și enzime, acizii aminați necesari nevoilor energetice.

3. Grație acestei dislocări se evită anumite fenomene de intoleranță care au fost observate atunci când se introduce în circulația sanguină o proteină sau o peptonă străină de organism. Se știe că introducerea acestora în circulația sanguină provoacă fenomene de șoc anafilactic. Dislocarea proteinelor prin travaliul digestiv evită pătrunderea în circulația generală a proteinelor și peptonelor intacte cu moleculă mare.

Rolul proteinelor alimentare

Este de a procura organismului aminoacizii esențiali necesari, după cum am văzut, sintezei proteinelor proprii organismului și sintezei unor compuși biologici esențiali (amine biogene, enzime, hormoni), cum și o parte din amoniacul necesar menținerii echilibrului acido-bazic. Prin experiențele pe animal s'a constatat că se pot înlocui proteinele din rația alimentară printr'un amestec bine echilibrat, bine proporționat, de acizi aminați diverși, fără ca organismul să sufere. Acest lucru a pus problema utilizării hidrolizatelor de proteine sau a amestecurilor de aminoacizi în vederea unui aport necesar de azot în anumite boli și în convalescență.

In organism, proteinele tisulare sunt în continuă transformare. Ele pot fi sintetizate din acizii aminați și sunt degradate tot până la acizi aminați printr'un proces hidrolitic analog hidrolizei digestive, sub acțiunea *catepsinelor*, enzime tisulare cu acțiune homospecifică cu aceea a enzimelor digestive. Aminoacizii din proteinele alimentare intră rapid în echilibru biologic cu aminoacizii din organism, unde, fie că sunt încorporați în proteinele formate aci, fie că intră în lanțul transformărilor și funcțiilor fiziologice ale acestor compuși. Acizii aminați sunt stadiul intermediar crucial al degradării proteinelor și al sintezei lor. In acest punct, metabolismul intermediar al proteinelor se confundă cu acela al metabolismului intermediar al aminoacizilor. Ne vom ocupa deci în cele ce urmează de metabolismul acestor compuși.

METABOLISMUL GENERAL AL ACIZILOR AMINAȚI

Transformările pe care le pot suferi acizii aminați rezultați din desfacerea hidrolitică a proteinelor (alimentare sau tisulare) sunt următoarele:

1. **Degradarea totală** până la produsele finale CO_2, H_2O și NH_3, cu eliberare de energie necesară vieții. Această degradare se face însă în etape succesive, cu producere de compuși intermediari care au și ei, ca atare, un rol fiziologic important.

2. **Transformarea în proteine tisulare** proprii diverselor organe.

3. **Transformarea în reactivi biologici esențiali**, amine biogene (histamina, de exemplu; amoniac).

Scanned with OKEN Scanner

4. **Transformarea în alţi compuşi ternari,** de exemplu glucide şi lipide.
5. **Transformarea în compuşi aminaţi** sub acţiunea bacteriilor intestinale (ptomaine, fenoli, crezoli).

Acizii aminaţi sunt produse indispensabile vieţii organismului. Vom vedea că unii din ei pot fi sintetizaţi chiar în organism, astfel că acesta nu se limitează numai la aportul lor prin alimentaţie. In organism există un schimb continuu de grupări aminice, care se separă dela unii aminoacizi şi sunt primiţi de alţi compuşi, realizându-se un echilibru dinamic permanent între degradarea şi sinteza acizilor aminaţi. Vom analiza mecanismele chimice care realizează aceste transformări şi anume mecanismele de degradare şi de sinteză a aminoacizilor, respectiv de catabolism şi de anabolism a acestor compuşi.

CATABOLISMUL AMINOACIZILOR

Am văzut că problema degradării proteinelor se reduce la aceea a acizilor aminaţi, formă de absorbţie a proteinelor în organism.

Produsele finale ale degradării acizilor aminaţi sunt CO_2, H_2O şi NH_3. Degradarea aceasta nu se face direct, ci printr'un şir complex de reacţii intermediare. Fiecare etapă intermediară are la rândul ei o raţiune fiziologică, componentele care rezultă putând fi degradate la rândul lor direct în CO_2, H_2O şi NH_3 sau putând fi utilizate pentru formarea altor compuşi. Energia maximă conţinută în acizii aminaţi se eliberează însă cu ocazia degradării lor în produsele finale CO_2, H_2O şi NH_3.

Degradarea acizilor aminaţi începe iniţial prin eliminarea uneia sau a ambelor grupări funcţionale, a grupării aminice (NH_2) şi a grupării carboxilice (COOH), adică prin desaminare sau prin decarboxilare.

Desaminarea duce la formare de amoniac (care va fi eliminat ulterior sub formă de uree) şi de corpi ternari (care la rândul lor pot suferi căi de degradare diferite).

Decarboxilarea duce la amine, dintre care unele sunt foarte importante pentru organism (histamina), iar altele, în special cele degradate în intestin sub acţiunea bacteriilor intestinale, sunt toxice.

Vom analiza aceste căi de degradare în parte, calea curentă de degradare a aminoacizilor fiind însă aceea de desaminare iniţială.

Desaminarea aminoacizilor

Desaminarea aminoacizilor este cea mai frecventă cale de degradare a acestora în organism.

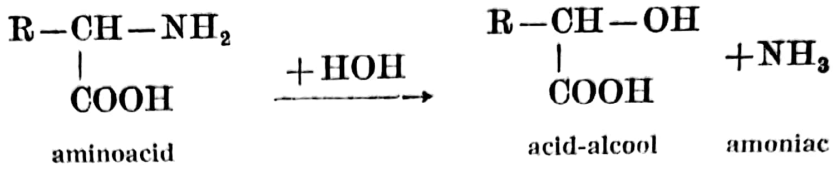
Mecanismul desaminării se poate realiza teoretic pe trei căi şi anume :

1. *desaminare oxidativă,*
2. *desaminare hidrolitică,*
3. *desaminare reductivă.*

1. **Desaminarea oxidativă** este o reacţie reversibilă, care duce la formare de amoniac şi acizi cetonici :

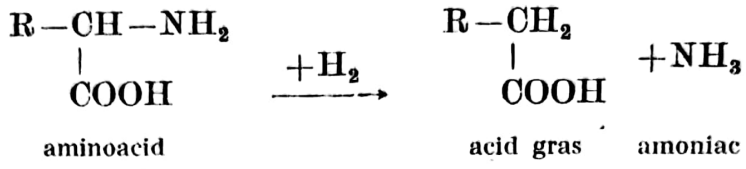
$$\underset{\text{aminoacid}}{R-\underset{\displaystyle COOH}{\underset{|}{CH}}-NH_2} \xrightarrow{\frac{1}{2}O_2} \underset{\text{cetoacid}}{R-\underset{\displaystyle COOH}{\underset{|}{C}}=O} + \underset{\text{amoniac}}{NH_3}$$

2. **Desaminarea hidrolitică** duce la formare de amoniac şi acid-alcool.



aminoacid — acid-alcool — amoniac

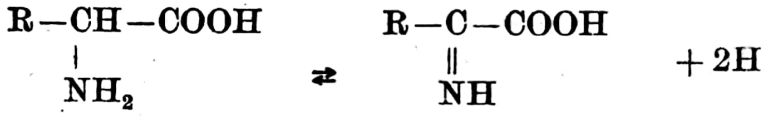
3. **Desaminarea reductivă** duce la formare de amoniac şi acid gras :



aminoacid — acid gras — amoniac

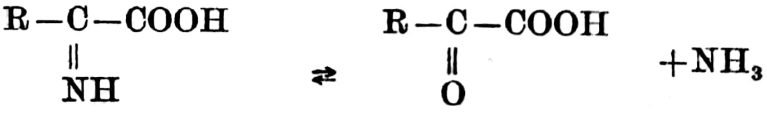
Toate aceste trei căi de desaminare sunt experimental posibile. La unele bacterii s'ar produce desaminarea hidrolitică. In organismul animal se pare că desaminarea oxidativă este calea de predilecţie a acestui proces. Desaminarea oxidativă şi reacţia sa reversibilă, aminarea reductivă, s'ar petrece în două faze : o fază de dehidrogenare enzimatică cu formare de iminoacid, şi o a doua, neenzimatică, cu hidroliza spontană a acidului iminic şi formare de cetoacid şi amoniac :

1.



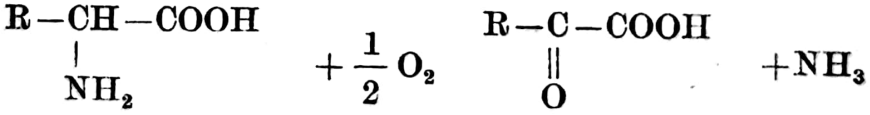
aminoacid — iminoacid

2.



iminoacid — cetoacid — amoniac

sau, însumând ambele reacţii :



aminoacid — cetoacid — amoniac

Experienţele lui Krebs, efectuate pe ţesuturi şi extracte tisulare, confirmă existenţa acestui mecanism. Krebs, lucrând pe ficatul perfuzat, pe secţiuni renale şi hepatice sau pe extracte de pulbere renală şi hepatică deshidratate în prealabil cu acetonă, constată că adăugarea de aminoacizi acestor diverse sisteme, în condiţii anumite de temperatură şi pH, duce la formare de acizi cetonici şi amoniac. Această formare necesită prezenţa oxigenului, deci desaminarea se face pe cale oxidativă. Din datele experimentale mai rezultă că puterea desaminantă cea mai intensă o au parenchimul renal şi hepatic (celelalte ţesuturi au o putere desaminantă nemăsurabilă) şi că desaminarea are loc cu o viteză apreciabilă, dar diferită

Scanned with OKEN Scanner

pentru diverşii aminoacizi, aminoacizii neesenţiali fiind desaminaţi mai repede decât cei esenţiali. Aminoacizii seriei *D* sunt desaminaţi de către pulpa renală şi hepatică cu o viteză mai mare decât cei ai serjei naturale *L*, iar extractele acestor ţesuturi (după deshidratare şi degresare cu acetonă) nu mai desaminează decât aminoacizii seriei *D*. Acest fapt ar arăta că enzima care catalizează reacţia de desaminare a *L*-aminoacizilor este dependentă de integritatea celulară şi se deosebeşte, din acest punct de vedere, de enzima de desaminare a *D*-aminoacizilor.

D-aminoacidoxidaza, care catalizează prima etapă a reacţiei de desaminare oxidativă a *D*-aminoacizilor, a fost izolată de Krebs : este o enzimă de tipul flavinelor, un flavin — adenindinucleotid, cu rol de transportor de hidrogen, care poate ceda acest hidrogen direct oxigenului molecular; este o *dehidrază oxitropă*. A fost izolată din rinichi şi din nucleii celulelor hepatice. Prin purificare îşi modifică în anumită măsură activitatea (Karrer), nu e inhibată de CNH, nu desaminează decât seria *D*-aminoacizilor. Viteza acţiunii ei variază cu aminoacidul respectiv. Din acest punct de vedere, aminoacizii se pot clasa în trei grupe : 1) aminoacizii desaminaţi rapid de *D*-aminodehidrază (*D*-alanina, *D*-valina, *D*-acidul aspartic, *D*-fenilalanina, *D*-tirozina, *D*-norleucina); 2) aminoacizii desaminaţi lent (în ordine descrescândă) : *D*-leucina, *D*-histidina, *D*-arginina, *D*-serina, *D*-prolina, *D*-acidul glutamic ; 3) aminoacizii nedesaminaţi (*D*-cistina, *D*-lizina, *D*-glicocolul).

L-aminoacidoxidaza a fost izolată din parenchimul renal şi hepatic al mai multor specii animale (şobolan, iepure, pisică, porc). Din parenchimul renal al şobolanului, enzima a fost izolată în stare pură (din 5 kg rinichi de şobolan, 1 g preparat enzimatic activ pur). Este deasemenea o flavinenzimă care există în cantitate mică în ţesuturi şi are un *număr de transfer* (numărul care arată de câte ori enzima se poate reduce şi oxida pe minut) foarte mic. Are acţiune enzimatică de desaminare asupra a 13 aminoacizi naturali (seria *L*) : leucina, metionina, prolina, norleucina, norvalina, fenilalanina, triptofanul, izoleucina, tirozina, valina, histidina, cistina, alanina. Nu desaminează glicocolul, serina şi treonina (hidroxiaminoacizii) şi acizii diamino- sau dicarboxilici.

S'au izolat : o *L-glicocoloxidază* (glicocoldehidrază), specifică pentru desaminarea oxidativă a glicocolului şi a sarcozinei; este deasemenea o flavinenzimă care a fost izolată prin precipitare fracţionată din rinichi, după deshidratare şi degresare cu acetonă; are pH-ul optim = 8,3; o *L-acidglutamicdehidrază*, având drept substrat specific acidul glutamic, pe care îl desaminează oxidativ. Este o dehidrază, nu o flavinenzimă ca celelalte desaminaze. Desaminează acidul glutamic pe cale oxidativă, coenzima I fiind acceptorul intermediar de hidrogen; este deci o dehidrogenază tipică. Se găseşte în diverse ţesuturi (ficat, rinichi, inimă, creier) şi posedă o mare activitate enzimatică, chiar în preparatele purificate.

Din cele expuse se vede că în mecanismul de desaminare oxidativă s'au pus până acum în evidenţă, la mamifere, următoarele enzime care ar putea interveni : *D*-aminoacidoxidaza , *L*-aminoacidoxidaza, *L*-glicocoloxidaza şi *L*-acidglutamicdehidraza — primele trei fiind flavinenzime, iar ultima o dehidrază tipică, necesitând prezenţa coenzimei I ca acceptor intermediar de hidrogen.

Desaminarea aminoacizilor se poate realiza în organism şi printr'un mecanism diferit de acela al desaminării, cu formare de amoniac, şi anume,

Scanned with OKEN Scanner

printr'un transfer al grupării aminice de pe aminoacid pe alte molecule. Mecanismul acesta de transfer, care este de fapt o transdeaminare şi are numele de *transaminare*, este unul din mecanismele de bază care vom vedea că intervine atât în degradare, cât şi în sinteza aminoacizilor.

Transaminarea

In 1937, cercetătorii sovietici Braunştain şi Criţman demonstrează existenţa în ţesuturile animale a unei reacţii de importantă semnificaţie biologică, căreia i-au dat numele de transaminare, reacţie care constă din transferul grupării aminice de pe un aminoacid pe un cetoacid, conducând la formarea unui aminoacid şi a unui cetoacid nou. In ţesutul viu, reacţia este catalizată enzimatic şi se petrece fără eliberare de amoniac.

Cercetări ulterioare au arătat importanţa biologică a acestui mecanism pentru metabolismul celular şi au dovedit rolul central pe care îl ocupă în acest transfer aminoacizii monoaminodicarboxilici şi anume acidul *l*(+)-*aspartic* şi în special homologul său superior, acidul *l*(+)-*glutamic*. Au fost descrise trei reacţii fundamentale în care intervine acest mecanism.

1. *acid glutamic* + *acid piruvic* ⇄ *acid α-cetoglutaric* + *alanină*;
2. *acid glutamic* + *acid oxaloacetic* ⇄ *acid α-cetoglutaric* + *acid aspartic*;
3. *acid aspartic* + *acid piruvic* ⇄ *acid oxaloacetic* + *alanină*.

(1) $HOOC-CH_2-CH_2-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH + CH_3-CO-COOH \rightleftarrows$

acid glutamic — acid piruvic

$HOOC-CH_2-CH_2-\underset{\displaystyle O}{\underset{\|}{C}}-COOH + CH_3-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH$

acid α-cetoglutaric — *l*-alanină

(2) $HOOC-CH_2-CH_2-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH + HOOC-CH_2-CO-COOH \rightleftarrows$

acid glutamic — acid oxaloacetic

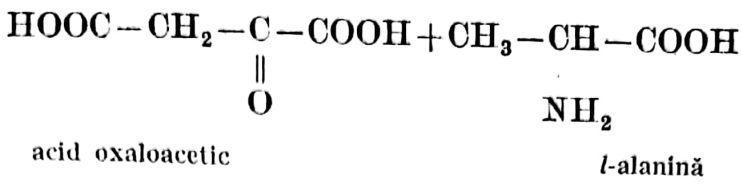
$HOOC-CH_2-CH_2-CO-COOH + HOOC-CH_2-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH$

acid α-cetoglutaric — acid aspartic

(3) $HOOC-CH_2-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH + CH_3-CO-COOH \rightleftarrows$

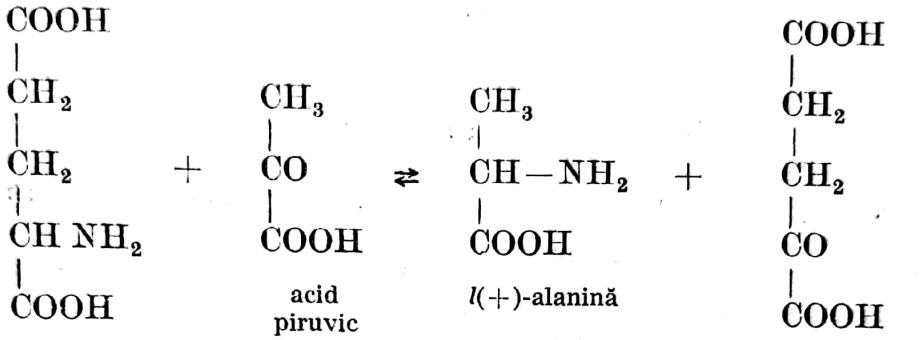
acid *l*-aspartic — acid piruvic

Scanned with OKEN Scanner



acid oxaloacetic — *l*-alanină

Braunştain şi Criţman au arătat că, punând în contact ţesut hepatic sau muscular cu acid *L*-glutamic şi acid piruvic, se constată formarea de acid α-cetoglutaric şi alanină:



acid *l*(+)-glutamic — acid piruvic — *l*(+)-alanină — acid α-cetoglutaric

Reacţia aceasta este perfect reversibilă, acidul α-cetoglutaric reformând în prezenţa *l*(+)-alaninei acidul *l*(+)-glutamic şi acidul piruvic. Intr'adevăr, pornind dela acidul glutamic şi acidul piruvic adăugaţi ţesutului muscular, după 20 de minute se ajunge la un echilibru care corespunde dispariţiei a jumătate din acidul glutamic adăugat; pornind invers, dela alanină şi acid α-cetoglutaric, se formează acid glutamic şi acid piruvic cu aceeaşi viteză şi se atinge aceeaşi stare de echilibru. Această reacţie are loc şi in vivo. Experienţele realizate cu ^{15}N confirmă existenţa unei transaminări in vivo.

Transaminarea biologică este un fenomen enzimatic, iar enzimele implicate în această reacţie fac parte din grupa ferazelor. Luând în seamă reacţia pe care o catalizează, aceste enzime au fost denumite de Braunştain şi Criţman *aminoferaze* şi, de Cozen, *transaminaza*. Vom reveni ulterior cu detalii asupra acestor enzime.

Mecanismul transaminării

Reacţia de transaminare constă în transferul grupării aminice a unui aminoacid pe un cetoacid cu formarea unui aminoacid şi a unui cetoacid nou, reacţia fiind perfect reversibilă. Reacţia de transaminare, care în ţesutul viu are caracter enzimatic, poate fi interpretată ca fiind, în unele din etapele sale, analoagă unei reacţii de transaminare nebiologică, descrisă anterior. Această etapă comună corespunde formării intermediare a unei baze Schiff.

Reacţia de transaminare ar implica astfel următoarele etape:

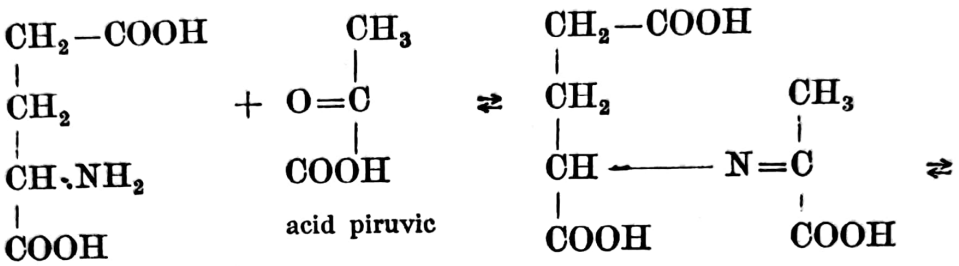
1. condensarea între aminoacid şi cetoacid cu formarea unui compus intermediar de tipul bazei Schiff (compus intermediar I);
2. modificarea tautomeră a acestei baze Schiff prin deplasarea dublei legături, ceeace duce la formarea unui alt compus intermediar (compusul

Scanned with OKEN Scanner

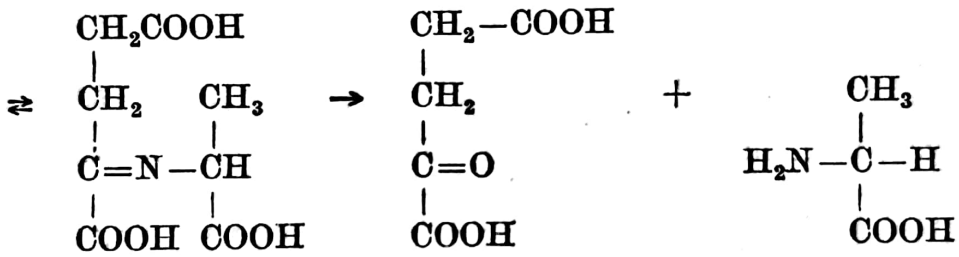
intermediar II). Acesta se realizează printr'o reacţie de oxidoreducere intramoleculară sau o regrupare prototropă [1] a punţii metilenazometinice, reacţie care constitue etapa enzimatică în mecanismul transaminării biologice (interconversiunea bazei Schiff I într'o formă tautomeră II).

3. Desfacerea spontană a acestui compus în produsele finale, care sunt aminoacidul şi cetoacidul nou format.

Deci, iniţial, are loc cuplarea produselor care reacţionează (aminoacidul şi cetoacidul iniţial), apoi remanierea internă a complexului format, iar ulterior, dedublarea în compuşii nou formaţi:



acid *l*(+) glutamic — acid piruvic — compus intermediar I (baza Schiff)

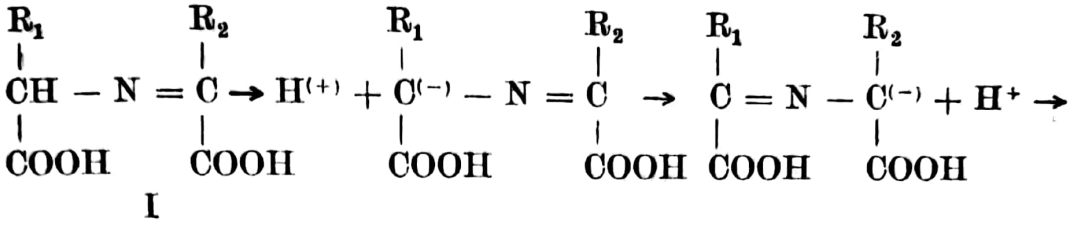


compus intermediar II — acid α-cetoglutaric — *l*(+)-alanină

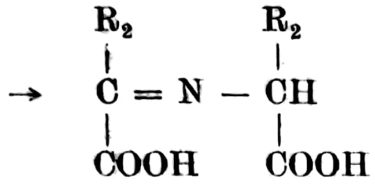
Mecanismul intim al reacţiei de transaminare a fost urmărit cu ajutorul izotopilor şi anume cu deuterium încorporat în molecula alaninei. Conicova, Crităman şi Tais lucrează cu α-deuterioalanină şi acid α-cetoglutaric în prezenţa enzimelor de transaminare (enzime impure însă). Autorii urmăresc dislocarea şi transportul hidrogenului care se produce în transaminarea enzimatică, nu însă şi în cea neenzimatică. In acest sistem se constată formarea acidului glutămic şi a acidului piruvic, majoritatea deuteriumului fiind regăsită în apă; acidul glutamic nu conţine excesul de deuterium. Acest fapt arată că α-deuteriumul din aminoacidul iniţial este labilizat şi, supus disocierii, trece în apă, unde înlocueşte hidrogenul; acesta la rândul lui se încorporează în aminoacidul nou format. Fapt interesant este că în transaminarea neenzimatică, urmărită cu ajutorul izotopilor (Herbst şi Rittenberg), nu are loc această dislocare a α-hidrogenului. Acest fapt arată că în reacţia de transformare tautomeră a bazei Schiff intermediar formate are loc în prezenţa enzimei o modificare prototropă, care constă în labilizarea şi disocierea hidrogenului, urmată de o deplasare a electronului la dubla legătură, de o deplasare electromeră a punţii metilenazometinice şi fixarea protonului din apă în poziţia α a aminoacidului nou format.

[1] Ionizarea intermediară a unui proton se numeşte prototropie.

Reacţiile ar fi :

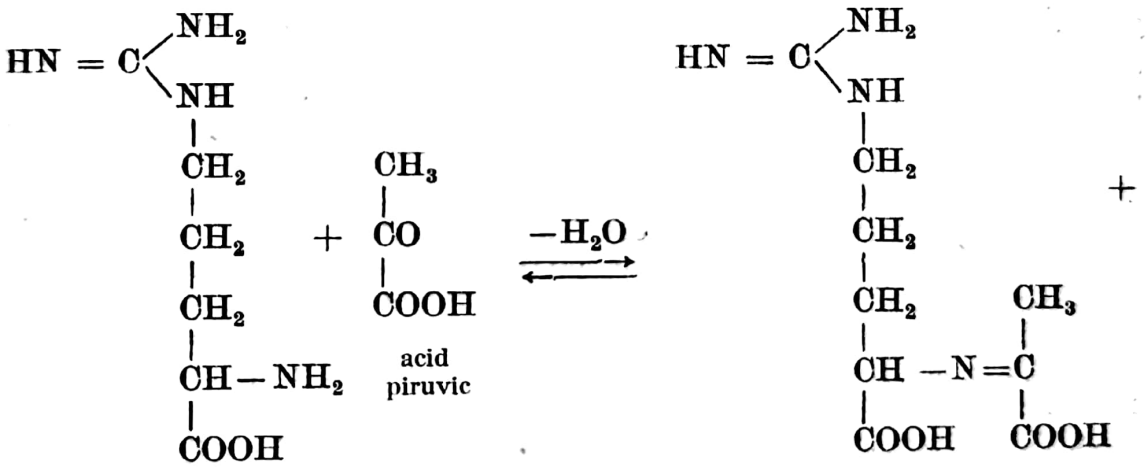


I

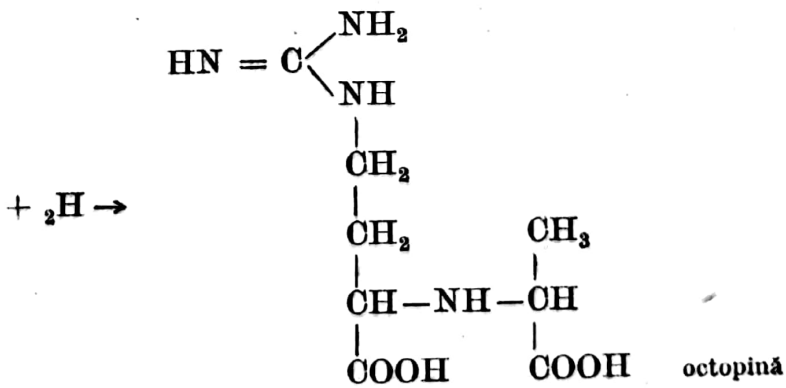


II

Faptele experimentale rezultate arată că labilizarea şi dislocarea α-hidrogenului, pe de o parte, şi transferul grupării aminice NH_2 şi a electronului, pe de alta, sunt două stadii distincte şi succesive ale catalizei enzimatice. Labilizarea este o funcţie termostabilă şi relativ nespecifică a enzimei şi constitue faza premergătoare aceleia de transfer al grupării aminice. Incercări de a izola sub formă pură un compus intermediar de tipul bazei Schiff, conţinând grupări de tipul metilenazometin, nu au reuşit. O confirmare importantă a existenţei posibile a acestui mecanism este izolarea din muşchiul unor animale marine, *Octopus* (caracatiţa) şi moluscul *Pecten*, a unui compus, octopină, de tipul bazelor Schiff. Acest compus apare după moartea animalului şi rezultă din condensarea argininei cu acidul piruvic, apariţia octopinei fiind concomitentă cu dispariţia argininei :



arginină — acid piruvic — izooctopină



octopină

Există deci posibilitatea formării, în condiții biologice, a unui compus de tipul bazelor Schiff, compus considerat a fi intermediar în reacția de transaminare. Octopina, *l*-arginină α-acid propionic, a fost sintetizată (Knoop și Martius) din arginină și acid piruvic prin hidrogenare catalitică în soluție apoasă.

Sistemul enzimatic al transaminării

Enzimele care catalizează reacțiile de transaminare fac parte din grupa ferazelor și sunt numite *aminoferaze* sau *transaminaze.* Crițman a pus în evidență două transaminaze : *glutamotransaminaza* și *aspartotransaminaza* care au drept substrat acidul glutamic, respectiv acidul cetonic corespunzător : acidul α-cetoglutaric, și acidul aspartic, respectiv acidul cetonic corespunzător, acidul oxaloacetic. Din mușchiul toracic al porumbelului și din inima de porc obține un preparat acelular care conține aceste două enzime.

Glutamicoaminoferaza catalizează reacția reversibilă de transfer al grupării aminice de pe acidul glutamic pe acidul piruvic cu formare de *l*-alanină și acid α-cetoglutaric și reacția de transfer de pe acidul glutamic pe acidul oxaloacetic, cu formare de acid aspartic și acid α-cetoglutaric, deci reacțiile 1 și 2. pH-ul optim al enzimei este 7,5, temperatura optimă de acțiune 40°.

O glutamicoaminoferază foarte mult purificată și foarte activă a fost obținută tot din inima de porc prin precipitări fracționate, adsorbții și eluții. Această enzimă catalizează numai reacția de transfer de pe acidul glutamic pe acidul piruvic (reacția 1), reacția 2, de transfer de pe acidul glutamic pe acidul oxaloacetic, fiind și ea catalizată de o altă enzimă, deasemenea prezentă în inima de porc. Ambele aminoferaze necesită prezența acidului glutamic sau a cetoacidului corespunzător, dar acțiunea lor diferă în ceeace privește specificitatea lor față de cetoacidul acceptor de grupare aminică.

Glutamicoaminoferaza care catalizează reacția 2 este extrem de activă, are un număr de transfer egal cu 8 600 (numărul de transfer indică numărul de molecule de substrat transformate de o moleculă de enzimă pe minut) ; aceea care catalizează reacția 1 este mai lentă (număr de transfer egal cu 640) ; în schimb, concentrația celei de a doua în mușchiul cardiac este mult mai mare (1,6 % față de 0,12 %), ceeace explică dece în țesutul intact predomină reacția 2 de transfer al grupării aminice de pe acidul glutamic pe acidul oxaloacetic cu formare de acid aspartic, reacția 1 de transfer al grupării aminice de pe acidul glutamic pe acidul piruvic cu formare de alanină fiind mai lentă.

Asparticoaminoferaza a fost deasemenea obținută de Crițman din inima de porc, din lichidul de presare autolizat la 0° ; enzima catalizează în mod reversibil reacția de transfer al grupării aminice de pe acidul aspartic pe acidul piruvic cu formare de acid oxaloacetic și *l*-alanină. Reacția este mai lentă decât în cazul celor două precedente ; pH-ul optim de activitate al enzimei este 7,4. Prin purificare și diluție, enzima este inactivată, probabil prin pierderea unei coenzime disociabile, deoarece inactivarea este înlăturată prin simplă adițiune de extracte tisulare fierte. Reacția catalizată de această enzimă este mai lentă decât aceea catalizată de glutamicoaminoferaze și unii cercetători contestau chiar existența

Scanned with OKEN Scanner

acestei enzime, emiţând ipoteza că reacţia aceasta este catalizată de fapt de amestecul celor două enzime glutamice: glutamicoaspartoaminoferaza şi glutamicoalaninoaminoferaza, acidul glutamic având rolul de transportor al grupărilor aminice. Studiul experimental al transaminării cu participarea diverşilor aminoacizi arată că reacţiile au o viteză apreciabilă şi că au loc numai cele două reacţii, şi anume:

1) *l*-acid glutamic + acid piruvic ⇄ *l*-alanină + acid α-cetoglutaric;

2) *l*-acid glutamic + acid oxaloacetic ⇄ *l*-acid aspartic + acid α-cetoglutaric.

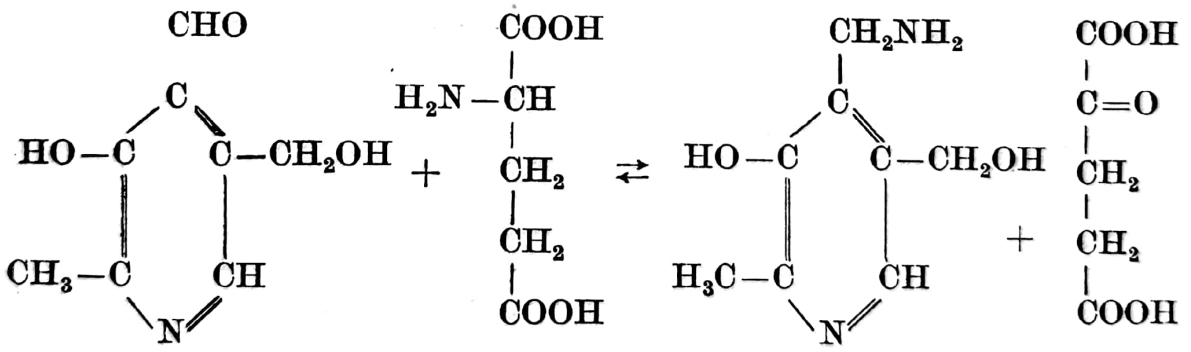
A doua reacţie predomină în ţesuturi, datorită concentraţiei mai mari a enzimei corespunzătoare. Deci, practic, numai aceste două reacţii ar avea o semnificaţie, reacţia: acid aspartic + acid piruvic ⇄ alanină + acid oxaloacetic, fiind rezultanta combinării celorlalte două reacţii.

Este probabil că şi reacţiile de transaminare cu alţi aminoacizi, deşi mai lente, pot interveni în metabolismul aminoacizilor. Se pare însă că aminoacizii care pot fi transformaţi printr'o cale oarecare în acid glutamic (histidina, prolina, hidroxiprolina, arginina) intră, prin intermediul acestui mecanism, în procesul transaminării.

Gruparea prostetică a transaminazelor

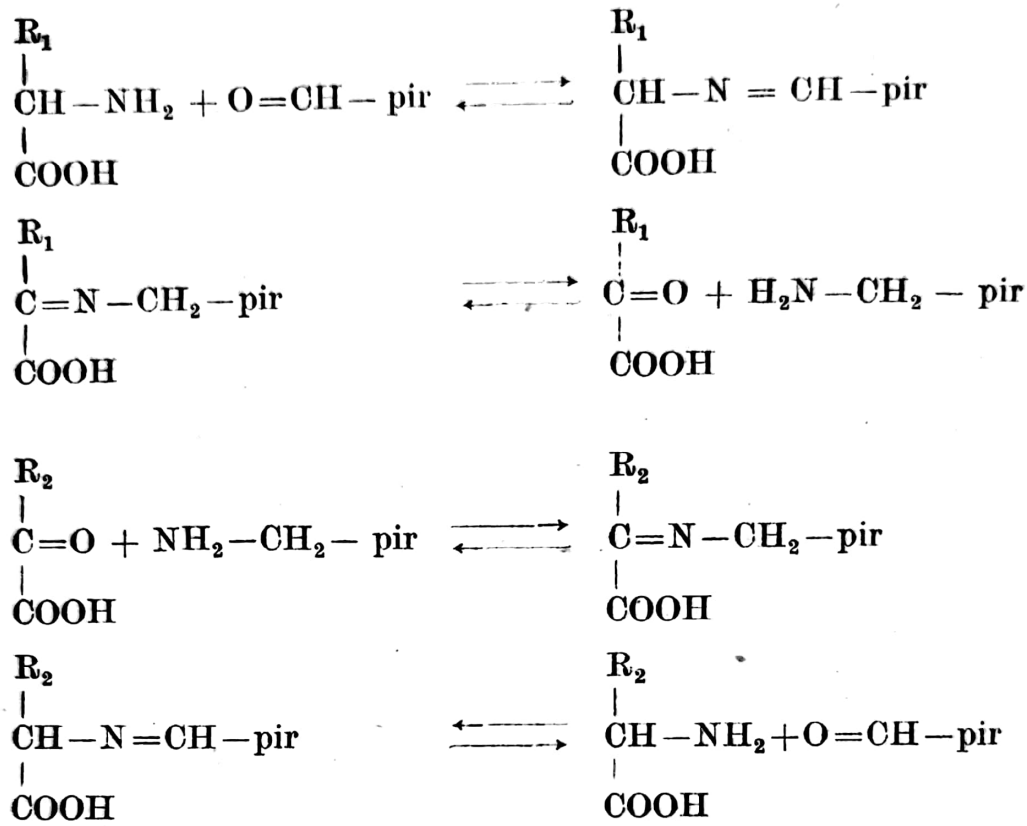
Purificarea transaminazelor arată ca necesară existenţa unei coenzime pentru activitatea acestora. Ultimele cercetări au adus dovezi că *vitamina B_6*, *fosfopiridoxalul*, ar fi un participant la acţiunea de transaminare a aminoferazelor. Astfel, la şobolanii în carenţă de vitamină B_6 se constată o scădere a reacţiei de transaminare cu 30—40%; aportul de vitamină B_6 restabileşte activitatea transaminazică.

Incălzind piridoxalul cu acid glutamic se obţin piridoxamină şi acid α-cetoglutaric:



Radicalul aldehidic piridoxal poate fi înlocuit cu uşurinţă cu gruparea aminică, astfel că piridoxalul poate funcţiona ca transportor intermediar al grupării aminice. Reacţia de transaminare în care piridoxalul, respectiv fosfopiridoxalul, ar interveni ca transportor al grupării aminice s'ar petrece în două faze succesive, şi anume: întâi gruparea aminică este transportată, prin formarea şi tautomerizarea bazei Schiff, pe gruparea activă a aminoferazei, pe coenzima care este piridoxalul; se formează astfel derivatul fosfopiridoxamina, care, ulterior, reacţionează cu cetoacidul acestei grupări aminice şi regenerează fosfopiridoxalul. Dacă se notează

cu O=CH—pir. gruparea activă a fosfopiridoxalului, schema reacţiilor ar fi :



şi

Experienţele lui Osipenco ar demonstra că gruparea aldehidică a componentei active din aminoferază ar forma baze Schiff şi compuşi de adiţiune, prin condensarea aminoacizilor cu gruparea prostetică a enzimei. Intr'adevăr, metilarea grupării aminice împiedică formarea bazei Schiff, dar împiedică şi transaminarea.

Transaminarea pare să fie o funcţie a ţesuturilor în general şi este, în raport cu alte reacţii enzimatice, un proces extrem de rapid. Organele cu activitate transaminazică intensă sunt şi sediul unei activităţi respiratorii intense. Studiul pe embrion arată că apariţia unei transaminaze în organe este concomitentă cu diferenţierea funcţională, de exemplu cu acumularea fosfocreatinei, şi cu apariţia posibilităţii de contracţie rapidă, în inimă cu stabilirea definitivă a ritmului cardiac, în rinichi cu începutul activităţii secretorii.

Deoarece transaminarea este un proces reversibil, urmează că moleculele de aminoacizi pot fi sintetizate prin intermediul şi pe seama acidului glutamic, fapt pe care îl vom vedea la capitolul următor, asupra sintezei aminoacizilor.

SINTEZA α-AMINOACIZILOR

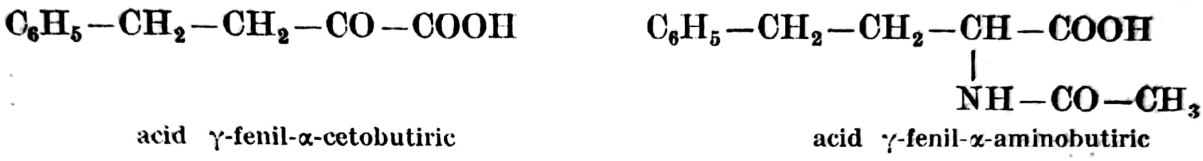
Capacitatea organismului animal de a sintetiza anumiţi aminoacizi a fost dovedită atât prin experienţele pe organe şi ţesuturi izolate, cât şi prin experienţele pe animalul intact. Folosirea atomilor izotopi a fost de un valoros ajutor în acest studiu permiţând lămurirea etapelor metabolice ale unor serii întregi de aminoacizi.

Scanned with OKEN Scanner

In sinteza aminoacizilor intervin aceleaşi mecanisme fundamentale ca şi în degradarea lor, reacţiile implicate în aceste procese fiind reversibile. Aceste mecanisme sunt: aminarea reductivă $\rightleftarrows$ desaminarea oxidativă şi transaminarea $\rightleftarrows$ transdesaminarea. Vom analiza fiecare mecanism în parte.

Sinteza prin aminare acetilantă

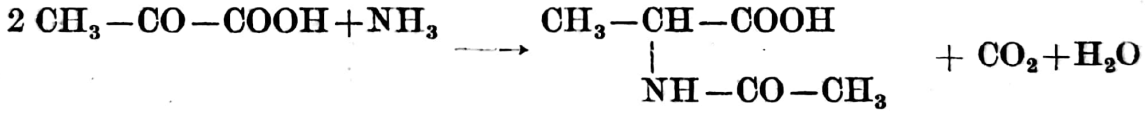
Alimentând un câine cu acid γ-fenil-α-cetobutiric, Knoop constată apariţia în urina acestuia a acidului γ-fenil-α-aminobutiric sub forma derivatului acetilat.



acid γ-fenil-α-cetobutiric — acid γ-fenil-α-aminobutiric

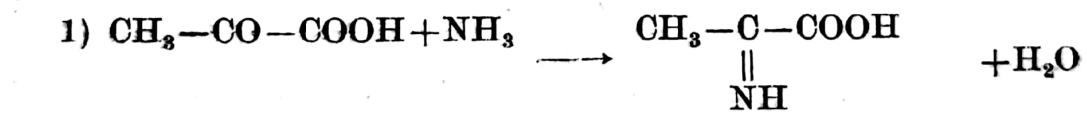
Se constată astfel excreţia aminoacizilor acetilaţi de către animalele care primesc acizii α-cetonici. In aminarea aminoacizilor are deci loc un proces suplimentar de acetilare, de unde denumirea de *sinteză acetilantă* sau *aminare acetilantă* dată acestui mecanism de sinteză. In această sinteză, *acidul piruvic* ar avea rol special şi multiplu, şi anume, ar funcţiona pe de o parte ca acceptor de grupare aminică, pe de altă parte ca donator de hidrogen specific şi, secundar, ca agent de acetilare.

Intr'adevăr, s'a constatat experimental că în soluţiile de piruvat cu amoniac are loc, în mod spontan, reacţia de formare a acetilalaninei.

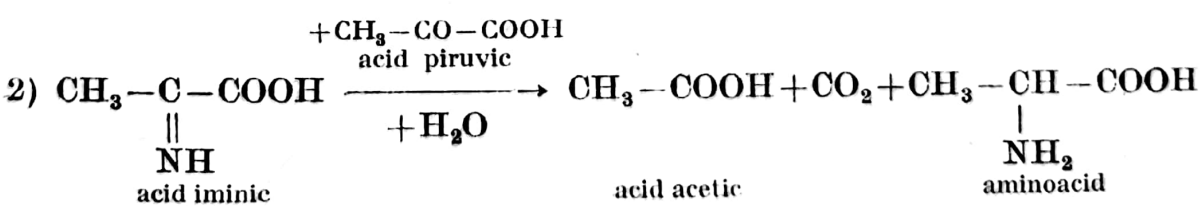


acid piruvic — acetilalanină

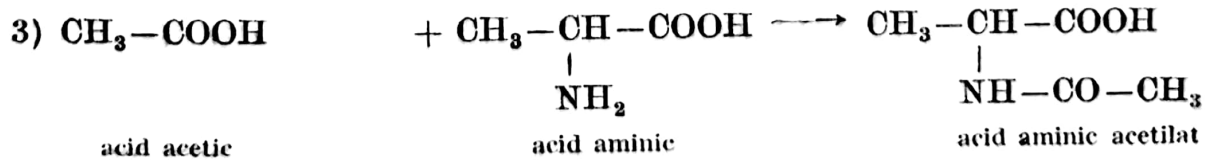
Reacţia se petrece însă în următoarele etape:



cetoacid (acid piruvic) — acid iminic



acid iminic — acid acetic — aminoacid

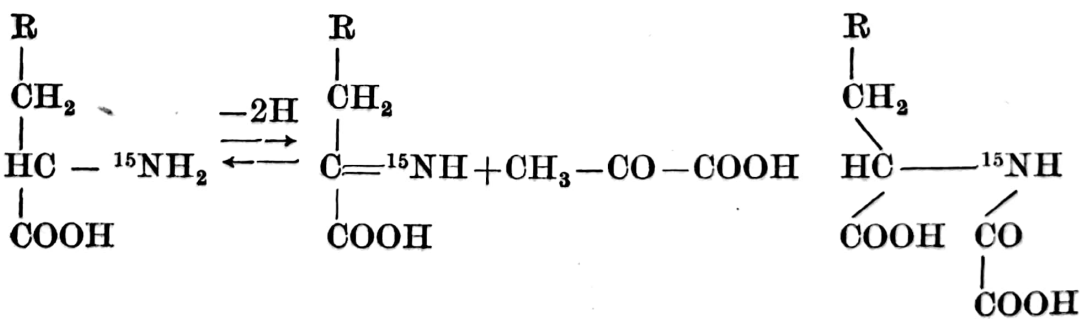


acid acetic — acid aminic — acid aminic acetilat

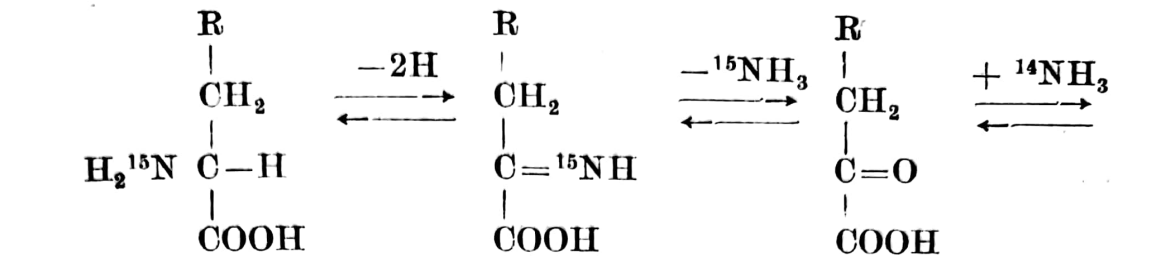
In această teorie se admite aminarea cetoacidului prin formarea intermediară a unui *iminoacid*; reducerea iminoacidului se realizează printr'o reacţie cuplată cu reacţia de scindare oxidativă a acidului piruvic, în acid acetic şi CO_2, acidul piruvic funcţionând atât ca donator de hidrogen specific cât şi, secundar, ca sursă de radical acetil; acidul acetic formează un derivat acetilat intermediar al aminoacidului, din care apoi, prin disociere, se formează aminoacidul corespunzător.

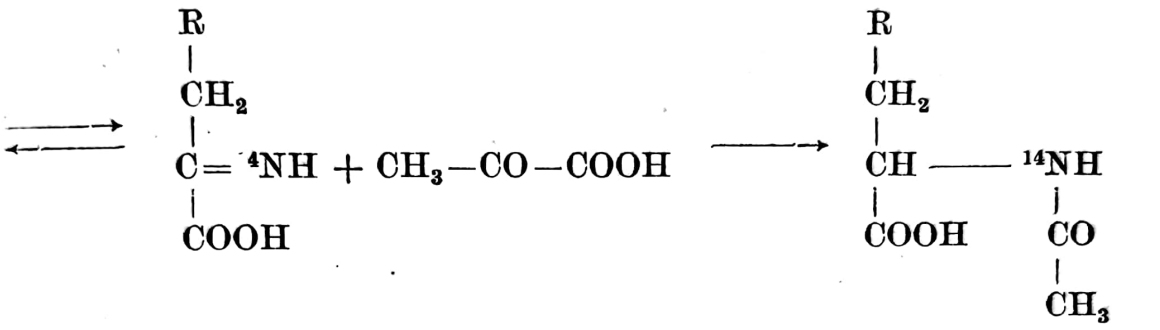
Se punea problema dacă acetilarea este o etapă primară şi normală în metabolismul aminoacidului. Cercetările lui Du Vigneaud şi Irish aduc argumente experimentale care pledează pentru această cale de sinteză şi confirmă observaţiile lui Knoop. Administrând unui câine acidul *D* (−)-fenilaminobutiric şi altuia acidul *L* (+)-fenilaminobutiric, ei izolează din urină în ambele cazuri acidul *L* (+)-acetilfenilaminobutiric, deci compusul ingerat a suferit în primul caz o inversiune şi o acetilare, în al doilea caz numai o acetilare fără inversiune. Du Vigneaud şi Schoenheimer, folosind atomi izotopi, confirmă acest mecanism. Administrând şobolanilor acid *L* (+)-fenilaminobutiric şi *D* (−)-fenilaminobutiric conţinând ^{15}N, izolează din urină în ambele cazuri acid *L* (+)-acetilfenilaminobutiric, dar, în primul caz, acidul *L* (+)-acetilfenilaminobutiric conţine ^{15}N, azotul izotop, pe când în cazul al doilea conţine ^{14}N. Folosind pe de altă parte ca mediu de reacţie apa grea pentru a putea urmări schimburile de hidrogen care au loc, constată că deuteriumul se regăseşte la carbonul α al aminoacidului, atât la derivatul rezultat după administrarea izomerului *D*, cât şi la derivatul rezultat după administrarea izomerului *L*.

Aceste fapte experimentale arată capacitatea organismului de a realiza inversiunea, de a izomeriza derivatul *D* în forma *L*. *Inversiunea*, aşa cum rezultă din faptele experimentale, implică înlocuirea totală a ^{15}N din moleculă şi, în acelaş timp, schimb de hidrogen, fenomen care, după Du Vigneaud, s'ar face prin următorul mecanism: hidrogenul dela carbonul α din molecula aminoacizilor fiind stabil, pentru a putea fi înlocuit (cu deuterium) trebue să fie prealabil labilizat; această labilizare se poate face prin stabilirea unei duble legături, prin dehidrogenarea aminoacidului, care trece deci în iminoacid şi, ulterior abia, în cetoacid. Acesta este mecanismul comun pentru izomerii *L* şi *D*. Izomerul *D* suferă însă şi un proces de inversiune în forma *L*, probabil în timpul formării intermediare a α-cetoacidului. Cetoacidul se condensează cu amoniacul endogen din sistem, conţinând ^{14}N, normal; ^{14}N trece din nou în iminoacid şi acesta la rândul său va reacţiona cu acidul piruvic formând acidul *L*-^{14}N-acetilaminoacid, care se elimină prin urină. Pentru izomerul *L*-^{15}N acetilat şi *D*-^{14}N acetilat ar fi deci următoarele reacţii:



izomerul L–^{15}N Izomerul L–^{15}N–acetilat





Inversiunea aminoacidului nenatural implică astfel înlocuirea totală a azotului din molecula originală. In comportarea celor doi aminoacizi izomeri în ^{15}N, *D* şi *L*, există diferenţe cantitative, deoarece viteza de dehidrogenare, pentru formarea iminoacidului este mai lentă la izomerul *L* decât la izomerul *D* şi astfel primul păstrează o cantitate mai mare de ^{15}N în moleculă.

Aceste experienţe arată capacitatea organismului de a realiza izomerizarea aminoacizilor, deci capacitatea acestuia de a folosi aminoacizii nenaturali, aceştia trebuind însă să fie în prealabil desaminaţi şi transformaţi în cetoacidul corespunzător înainte de a putea intra în ciclul reacţiilor de metabolizare normală. Aceşti aminoacizi nenaturali nu sunt însă folosiţi în egală măsură, fapt care se explică prin necesitatea inversiunii prealabile, ceeace presupune un proces suplimentar de desaminare şi transformare în cetoacidul corespunzător înainte de a intra în ciclul reacţiilor.

Numeroase experienţe (Crişman şi Melic Sarchisian, Caplanschi şi Carlina, etc.) au demonstrat în ţesutul hepatic şi renal formarea de aminoacizi, respectiv de alanină, din piruvat şi amoniac şi din acizii piruvic, oxaloacetic şi α-cetoglutaric. Acest proces se poate îmbina cu un mecanism de transaminare ; în primul caz, acela al formării din piruvat şi amoniac, reacţia ar implica mai multe faze, dintre care una ar fi formarea intermediară de acid glutamic sau aspartic care urmează a fi folosiţi ulterior în procesul de sinteză a aminoacizilor prin intervenţia mecanismului transaminării, după cum vom vedea în cele ce urmează.

Rolul transaminării în sinteza aminoacizilor

Cercetările mai recente interpretează mecanismul sintezei acetilante, în care acidul piruvic ar ocupa un loc special, tot printr'un proces de transaminare. S'a constatat că formarea alaninei din acid piruvic şi amoniac de către ficatul de şobolan necesită prezenţa CO_2, a fosfaţilor, a acidului

oxaloacetic sau a precursorilor acestuia. Reacţia de formare a alaninei ar cuprinde astfel mai multe etape :

1. Condensarea acidului piruvic cu CO_2 cu formare de acid oxaloacetic, conform unei reacţii cunoscute.

2. Acidul oxaloacetic, în prezenţa amoniacului şi a unui donator de hidrogen, printr'un proces de aminare reductivă, ar funcţiona ca acceptor de amoniac, ceeace ar duce la formare de acid aspartic.

3. Acidul aspartic, printr'un proces de transaminare pe acid piruvic va forma alanina, regenerând acidul oxaloacetic.

Rezultatele experimentale ale lui Criţman confirmă aceste etape de transformare. Extracte hepatice acelulare realizează aceste reacţii dacă se adaugă sistemului coenzimă, transportori de hidrogen şi de grupări aminice, fosfat, cozimază, mici cantităţi de acid oxaloacetic şi fumaric. Dintre toţi cetoacizii, acidul oxaloacetic este acceptorul cel mai activ al amoniacului. Hrănirea şobolanilor cu derivaţi acetilaţi, conţinând deuterium arată posibilitatea unui transfer de grupare acetilică între doi α-aminoacizi. Experienţe cu CO_2 radioactiv arată că aproape toţi atomii radioactivi asimilaţi în ficat se regăsesc în acidul glutamic şi aspartic. Rolul acidului piruvic ar fi acela de precursor al acidului oxaloacetic şi α-cetoglutaric, compuşi, care, ulterior, pot funcţiona ca acceptori de grupări aminice. Acizii dicarboxilici au astfel rol de bază în metabolismul aminoacizilor şi se pune problema sursei neproteice a acestor cetoacizi. Se ştie că aceştia apar în cursul metabolismului intermediar al glucidelor. Rolul special pe care îl ocupă acidul aspartic şi în special acidul glutamic, respectiv cetoacizii corespunzători, în metabolismul aminoacizilor se explică prin existenţa în organism a unor enzime specifice : asparticoaminoferaza, glutamicoaminoferaza şi glutamicodehidrogenaza. Deoarece transaminarea este un proces reversibil, urmează că moleculele de aminoacizi pot fi sintetizate pe seama acidului glutamic dacă în sistem există α-cetoacizii adecvaţi. Folosirea aminoacizilor marcaţi cu izotopi a permis urmărirea căilor metabolice de degradare şi sinteză a diverşilor compuşi. S'au administrat aminoacizi conţinând azot greu, carbon greu, deuterium şi animalul a fost sacrificat după un interval anumit. Determinarea izotopilor în azotul neproteic şi în aminoacizii din structura proteinelor din diversele organe şi ţesuturi indică următoarele : în organism are loc un schimb continuu de grupări aminice ; după administrarea de deuterium, acesta se regăseşte în aminoacizii din proteinele tisulare şi anume în glicocol, leucină, tirozină, prolină, arginină, histidină, cisteină, acid aspartic şi glutamic. Din aminoacizii cercetaţi, numai lizina nu conţine deuterium. Cantitatea cea mai mare o conţine acidul glutamic şi anume în 24 de ore 80% din acidul glutamic conţine deuterium. După administrare de ^{15}N încorporat diverşilor aminoacizi (glicocol, leucină, tirozină, etc.) se constată prezenţa acestuia în toţi aminoacizii, deasemenea cu excepţia lizinei. Cea mai mare cantitate se regăseşte în acidul glutamic, al doilea loc îl ocupă acidul aspartic. Administrarea de citrat de amoniu conţinând ^{15}N indică încorporarea acestuia, în toţi aminoacizii cu excepţia lizinei. In arginină, ^{15}N este încorporat în gruparea guanidinică. Cea mai mare cantitate este încorporată tot în acidul glutamic şi în acidul aspartic. Aceste experienţe pun în evidenţă un *schimb continuu* interdinamic *între gruparea aminică a unui aminoacid şi alte grupări aminice* şi arată că gruparea aminică a unui aminoacid nu este o componentă statică, ci în con-

tinuă transformare. Mai rezultă din aceste experienţe poziţia specială pe care o ocupă *acidul aspartic*, şi în special *acidul glutamic*, în acest interschimb al grupării aminice, în fixarea ei, fie de pe alţi aminoacizi, fie din alte surse de grupare aminică, cum sunt sărurile de amoniu. Acidul glutamic este aminoacidul care se desaminează cel mai rapid şi mai intens, atât prin desaminare reductivă, cât şi prin transaminare. Deasemenea, experienţele cu izotopi indică o participare foarte activă a acizilor glutamic şi aspartic în procesul de inversiune a aminoacizilor nenaturali prin marea lor aviditate pentru amoniac şi N-aminic, prin rolul central pe care îl au în mecanismul de transaminare.

Aminarea, desaminarea şi transaminarea acizilor dicarboxilici se petrec cu o viteză şi intensitate mai mari decât ale tuturor celorlalţi aminoacizi, procesele sunt reversibile şi au caracter dinamic pronunţat. Procesele de aminare, desaminare şi transaminare contribue fiecare la metabolismul aminoacizilor, participarea fiecărui mecanism fiind în funcţie de aminoacidul respectiv.

Participarea atât de activă a aminoacizilor dicarboxilici şi în special a acidului glutamic am văzut că îşi găseşte explicaţia în existenţa în organism a unor enzime specifice de mare activitate.

Datorită reacţiilor catalizate de aceste enzime, glutamicoaminoferaze şi glutamicodehidraze, prin intervenţia mecanismului de transaminare, se pot obţine prin sinteză diverşi aminoacizi, iar prin transportul grupării aminice a diverşilor aminoacizi pe acidul α-cetoglutaric se poate realiza şi desaminarea aminoacizilor pentru care nu există aminodehidraze specifice. Acidul glutamic pare deasemenea să fie un intermediar obligatoriu pentru introducerea grupării aminice în etapa citrulină-arginină din ciclul ureogenetic.

Demonstrarea posibilităţii de sinteză a aminoacizilor în ţesuturi pune problema necesităţii permanente de grupări aminice. Ele pot proveni dela alţi aminoacizi prin transaminare sau chiar dela amoniac, de exemplu în cazul inaniţiei proteinice. Amoniul fiind însă un ion toxic, urmează ca în organism să fie păstrat sub o formă nenocivă. S'ar putea ca glutamina la animale şi glutamina şi asparagina la plante, amide corespunzătoare acidului glutamic şi aspartic, să constitue o formă de depozitare a amoniacului.

Studiile cu izotopi folosite în cercetarea metabolismului aminoacizilor, respectiv al proteinelor, au pus în evidenţă *schimbul continuu la care sunt supuşi aminoacizii din componenţa proteinelor* (cu excepţia lizinei), acidul glutamic ocupând un rol central.

Acizii cetonici care pot fi aminaţi în organism pot proveni fie din desaminarea altor aminoacizi din organism, fie, lucru important, din alte componente neazotate, din zaharuri. Se ştie că în cursul metabolismului glucidic apar trei α-cetoacizi importanţi : acidul α-cetoglutaric, acidul oxaloacetic şi acidul piruvic. Din aceştia, printr'un proces de sinteză aminantă, reductoare sau prin transaminare, se poate ajunge la acid glutamic (din acidul α-cetoglutaric sub acţiunea catalitică a α-acidglutamicdehidrogenazei).

Din acidul glutamic, prin intervenţia glutamicoaminoferazei care transportă gruparea aminică pe acidul oxaloacetic, se obţine acidul aspartic, iar prin transportul pe acid piruvic se obţine alanina.

Scanned with OKEN Scanner

Rolul transaminării în metabolismul aminoacizilor şi respectiv al proteinelor este extrem de important şi, în legătură cu aceasta, acidul aspartic şi în special acidul glutamic ocupă un loc central. Prin intermediul acestora, graţie mecanismului de transaminare, se poate realiza sinteza altor aminoacizi. Sinteza acizilor glutamic şi aspartic este realizată la rândul ei pe seama amoniacului liber prin reacţii catalizabile de către sisteme enzimatice specifice; degradarea lor este deasemenea asigurată, datorită prezenţei unor dehidraze specifice foarte active (glutamicodehidraze, asparticdehidraze).

Cuplând acţiunea enzimatică a aminoferazei cu aceea a *l*-glutamicodehidrazei, se realizează un sistem capabil de a desamina un acid *l*-aminic natural, pentru care nu există o dehidrază specifică, prin intermediul acidului α-cetoglutaric. Este de reţinut faptul important că glutamicoaminoferaza şi glutamicodehidraza sunt cele mai active şi mai răspândite enzime din metabolismul azotat.

Deasemenea, prin acţiunea transaminazei, acidului glutamic, din diverşi acizi cetonici se pot obţine prin sinteză acizii aminaţi corespunzători care, la rândul lor, pot fi desaminaţi prin mecanismul de mai sus.

Prin intermediul acidului glutamic poate avea loc deci în organism *fixarea amoniacului* şi *eliminarea lui*, respectiv a N. Prin acest mecanism, acidul glutamic are un rol important în echilibrul azotat al organismului şi explică legea experimentală a echilibrului azotat în organism.

Acizii cetonici care pot fi aminaţi, pot proveni fie din desaminarea acizilor aminaţi, şi lucru important, din alimentele neazotate, din zaharuri după cum ştim (de exemplu, acidul piruvic e produs intermediar). Prin aceasta se face o menajare a proteinelor cu ajutorul glucidelor. In prezenţa unui surplus de zaharuri, acizii α-cetonici, produse de degradare ale glucidelor, se vor uni cu amoniacul, produs de eliminare al proteinelor şi vor reface acizii aminaţi printr'un proces de sinteză aminantă reductoare. Intr'adevăr, cu ajutorul sintezei aminante reductoare dela $NH_3 + H_2 +$ +acid α-cetoglutaric se ajunge la acid *l*-glutamic; din $NH_3 + H_2 +$ acid oxaloacetic, la acidul aspartic. Pornind dela aceştia, prin transaminare pe alţi acizi cetonici se poate realiza aproape toată seria de acizi *l*-α-aminaţi. Reînnoirea rapidă a azotului din molecula proteinelor (după cum s'a dovedit prin experienţele cu izotopi) — caracter dinamic al structurii proteinelor — este datorită în mare măsură mecanismului de transaminare, mecanism de schimb rapid al N din moleculă şi al aminoacizilor, componente cheie în acest interschimb.

Datorită acestui mecanism se pot explica o serie întreagă de fapte obscure din metabolismul acizilor aminaţi, şi anume: degradarea unor anume acizi aminaţi naturali şi sinteza unor acizi aminaţi. Prin aceasta se va explica echilibrul care există între acizii aminaţi din mediul celular şi acizii aminaţi din proteinele tisulare. Intr'adevăr, între acizii aminaţi din circulaţie şi acizii aminaţi din proteinele tisulare există un echilibru chimic care reiese din faptul următor: acizii aminaţi din sângele uman exprimaţi în *N*, numit azot aminic, variază între 5—8 mg%. Aceste limite sunt puţin modificate în raport cu alimentaţia proteinică: după un aport excesiv de proteine sau după o inaniţie proteinică nu variază decât puţin. Acest echilibru părea neexplicabil, deoarece se ştie că nu există o depozitare de acizi aminaţi (respectiv de proteine) în organism (aşa cum există pentru glucide sau lipide), tot surplusul de acizi aminaţi neutilizaţi în

Scanned with OKEN Scanner

sinteza proteinelor fiind imediat transformat şi eliminat. Existenţa totuşi a unui echilibru între acizii aminaţi din circulaţie şi a celor din proteinele celulare se poate explica numai printr'un continuu schimb între aceşti acizi aminaţi, schimb care să ducă la o reîmprospătare a acizilor aminaţi din structura proteinelor celulare. Experienţe făcute cu acizi aminaţi având ^{15}N au arătat că există un schimb rapid şi continuu între acizii aminaţi liberi din mediul celular şi acizii aminaţi din structura proteinelor celulare. Acest schimb continuu explică echilibrul dintre aceste două sisteme, echilibru care, după cum vom vedea, e dinamic şi nu static.

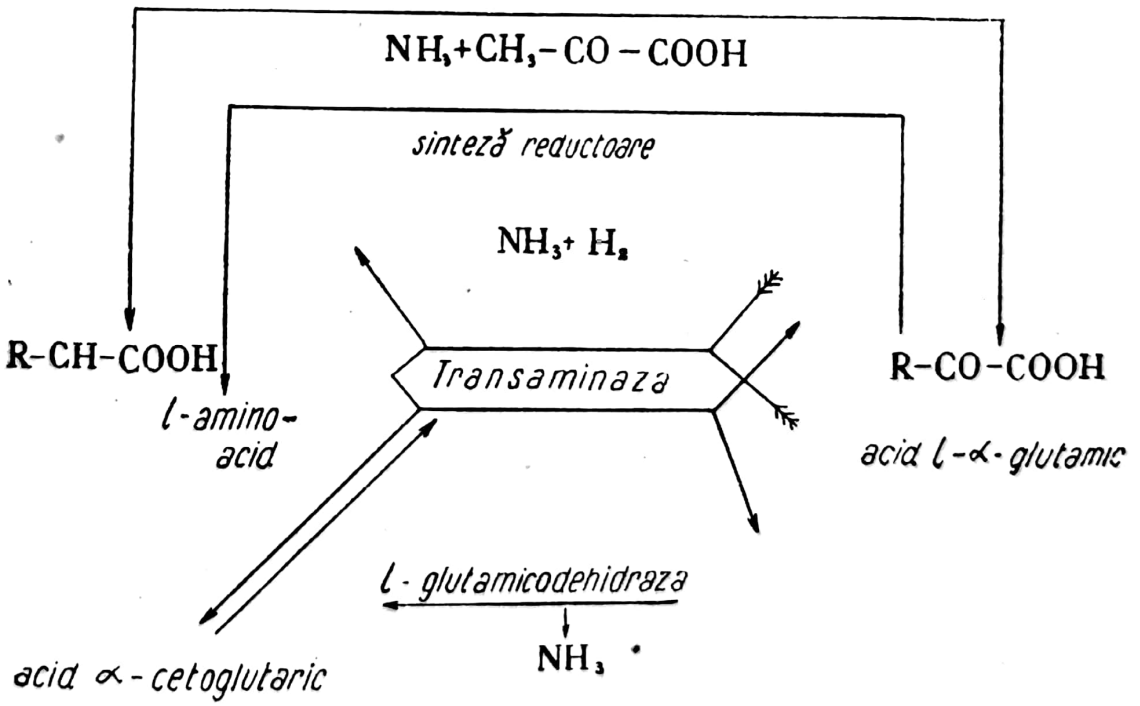
Nu se cunoştea cu precizie prin ce mecanism se realizează acest schimb continuu. Lucrările extrem de importante ale cercetătorilor sovietici asupra existenţei mecanismului de transaminare pot explica acest proces.

Prin transaminare se asigură echilibrul azotat în organism.

Legea echilibrului azotat a fost găsită experimental şi se poate formula astfel : un individ dat are un minimum necesar de azot proteinic ; pornind dela acest minimum există un echilibru între aportul şi eliminarea azotată. Această lege experimentală se poate explica prin existenţa mecanismului de transaminare, care reglează desaminarea şi sinteza acizilor.

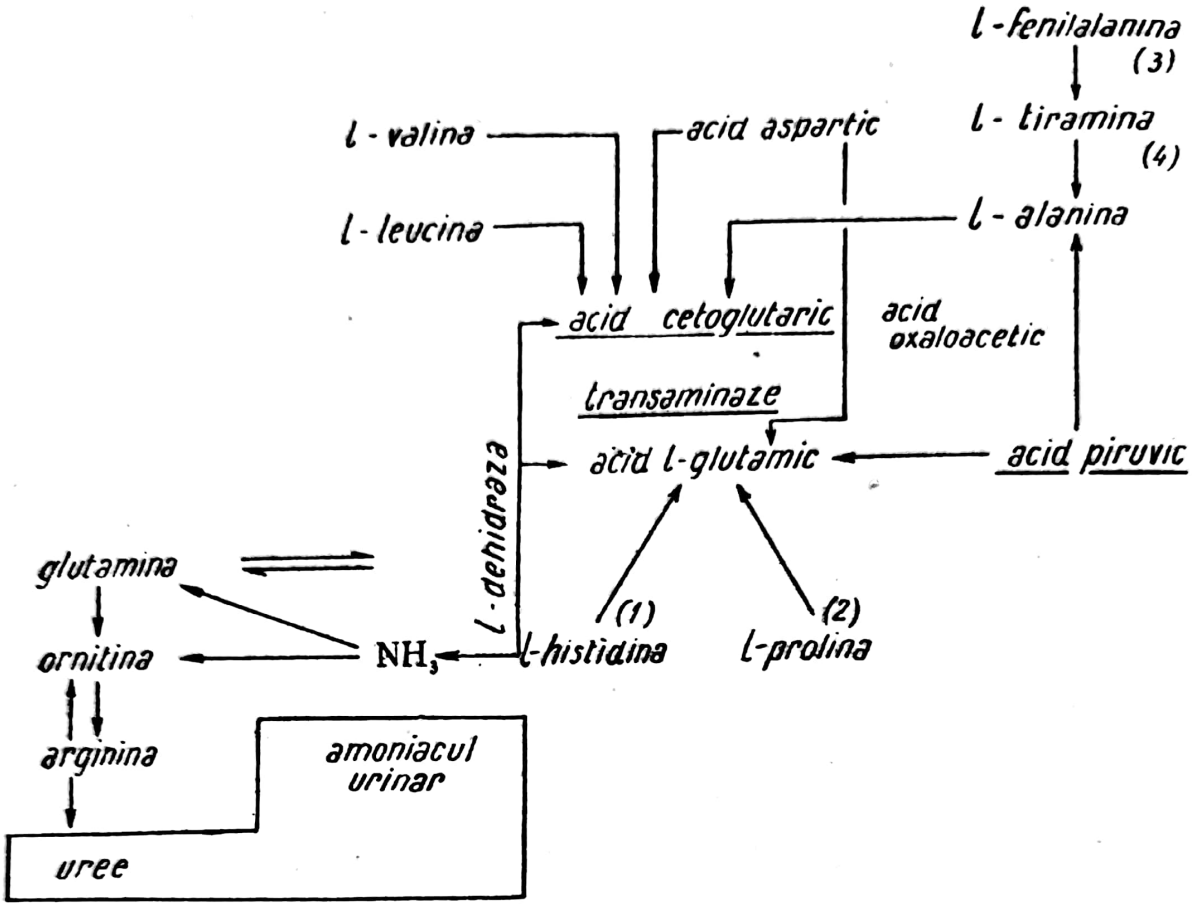
„Cercetările ulterioare au arătat importanţa capitală a transaminării pentru întregul metabolism tisular şi au dovedit că acizii aminaţi dicarboxilici ocupă un loc central în interacţiunea dinamică a elementelor metabolismului azotat la plante şi animale" [1].

Sinteza acetilantă a lui Knopp şi du Vigneaud



Geneza *l*-acizilor aminaţi

[1] *Braunştain A. L.* Biochimia metabolismului aminoacizilor.



(1) Prin histidază
(2) Prin enzimele renale
(3) Prin oxidare
(4) Prin oxidare în ficat
(5) Ciclul Krebs
(6) Ciclul Leuthard-Bach

Schema metabolismului acizilor *l*-aminaţi

METABOLISMUL AMONIACULUI

Oricare ar fi mecanismul prin care se realizează desaminarea aminoacizilor, produsele rezultate sunt amoniacul şi o componentă ternară, care poate fi un cetoacid, un alcool-acid sau un acid (acid gras). Metabolismul ulterior al aminoacizilor se reduce astfel la acela al amoniacului şi al componentei ternare rezultate.

Amoniacul este o componentă toxică (are o toxicitate de 1/20 000). Toxicitatea nu pare să fie legată de reacţia lui alcalină, deoarece cantităţi foarte mici (5 mg/100 cc) în sângele circulant la iepure pot duce la moartea animalului. Organismul animal se apără împotriva acţiunii toxice a amoniacului prin transformarea lui în componente netoxice care, ulterior, sunt sau eliminate sau depozitate sub forma unui compus nenociv, şi anume, ca glutamină sau asparagină.

In raport cu forma de eliminare a amoniacului, animalele se pot divide în *ureotelice*, *uricotelice* şi *amoniotelice*. Animalele ureotelice elimină amoniacul sub formă de uree, cele uricotelice sub formă de acid uric, iar cele amoniotelice, sub formă de amoniac. Existenţa acestor tipuri de eliminare se pare că este determinată de natura mediului înconjurător al organis-

Scanned with OKEN Scanner

mului. Calea de detoxificare a amoniacului este o adaptare la restricţiile aportului de apă.

Nevertebratele acvatice sunt amoniotelice, deoarece pot elimina cu uşurinţă amoniacul în apa în care trăiesc. Nevertebratele terestre, animale care s'au adaptat la o viaţă terestră, neavând la dispoziţie acest mediu pentru îndepărtarea amoniacului, îl transformă într'un compus inofensiv şi greu solubil, acidul uric, care poate fi excretat sub formă solidă.

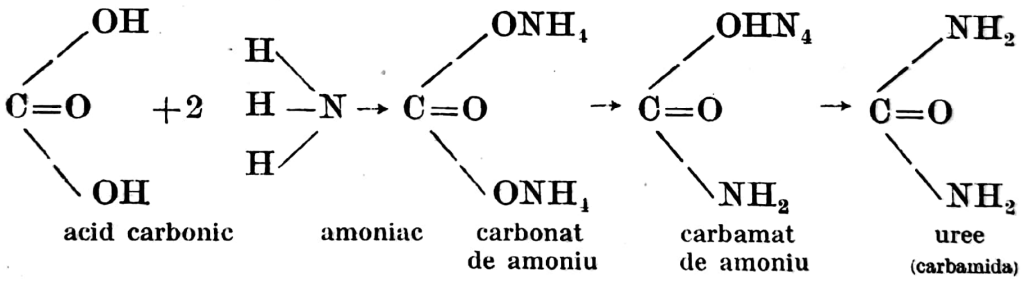
Ureotelismul apare la animalele vertebrate, la mamifere. Ureea fiind un compus foarte solubil, nu necesită cantităţi mari de apă pentru a fi eliminată.

Mecanismul formării ureei (ureogeneza)

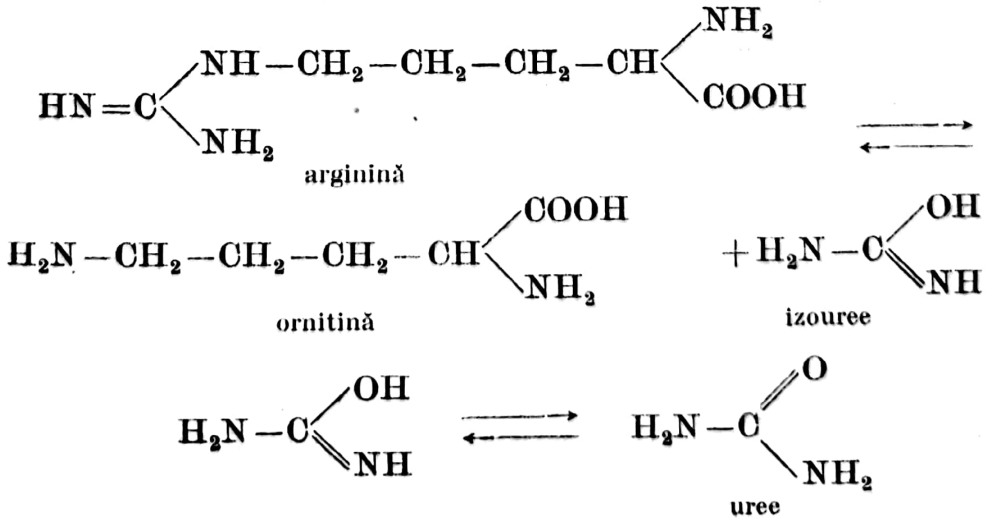
Ciclul ureogenetic (Krebs şi Henseleit).

La mamifere, ureea este forma de detoxificare a amoniacului. Sediul de transformare a amoniacului în uree este ficatul; ureogeneza este astfel o funcţie hepatică. Experienţe efectuate pe câine arată că hepatectomia duce la oprirea formării de uree. Sursa nehepatică a ureei este cantitativ neglijabilă.

Teoriile clasice care admiteau formarea ureei direct din amoniac şi CO_2 liber s'au dovedit inexacte. Aceste teorii admiteau formarea intermediară de carbonat de amoniu (sarea de amoniu a acidului carbonic). Această reacţie s'ar petrece astfel:



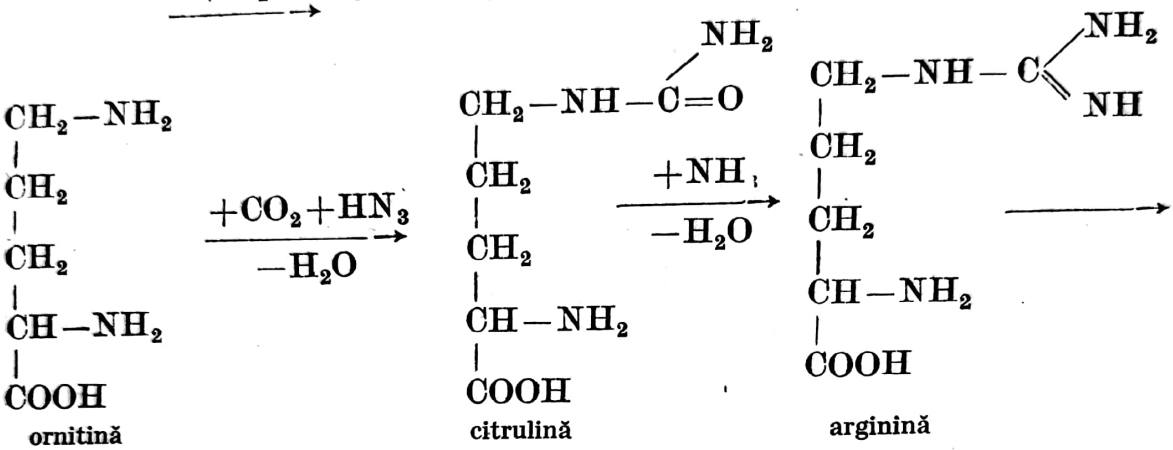
Formarea directă a ureei din acizii aminaţi se cunoaşte numai pentru un singur aminoacid, *arginina*, pentru care există o enzimă specifică, *arginaza* care transformă arginina în uree şi ornitină (acid diaminat α, δ-monocarboxilic cu 5 C), reacţia aceasta fiind enzimatică şi reversibilă:

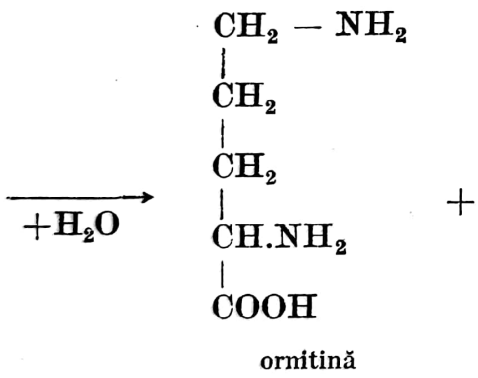


Prezența unei arginaze în toate organele ureoformatoare, ca de exemplu în ficatul mamiferelor, și absența ei în ficatul reptilelor și păsărilor, la care amoniacul e eliminat nu sub formă de uree, ci sub formă de acid uric, precum și anumite experiențe care indicau că adăugarea de ornitină, citulină sau arginină unui amestec de acizi aminați mărește eliminarea de uree, au dus pe *Krebs* și *Henseleit* (1932) la formularea următorului mecanism de formare a ureei în ficat, în care ornitina ar avea rol catalitic :

ornitină + amoniac + CO_2 $\xrightarrow[-H_2O]{}$ citrulină $\xrightarrow[-H_2O]{+NH_3}$ arginină

$\xrightarrow{+H_2O}$ ornitină + uree



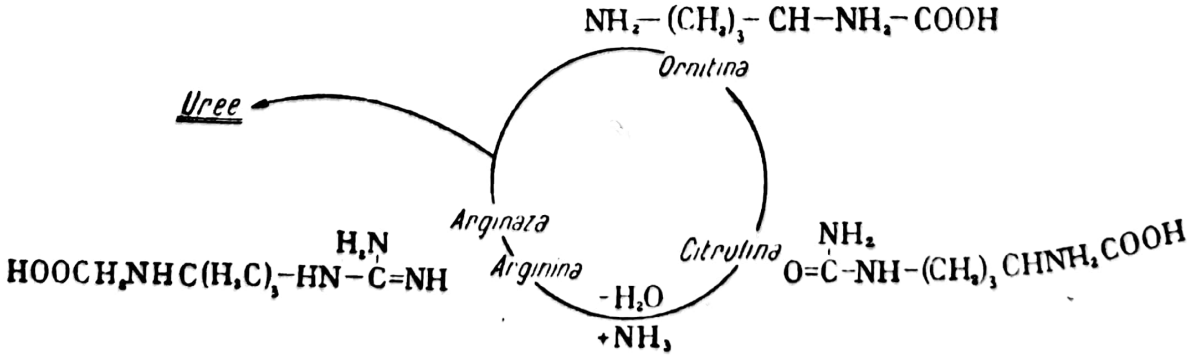


Ornitina joacă rol de catalizator. Reacția se petrece în trei stadii.

1. Fixarea unei molecule de amoniac și CO_2 la carbonul din molecula ornitinei și eliminarea unei molecule de apă, ceeace duce la formarea citrulinei.

2. Fixarea unei a doua molecule de amoniac cu scindarea unei molecule de apă dă arginina.

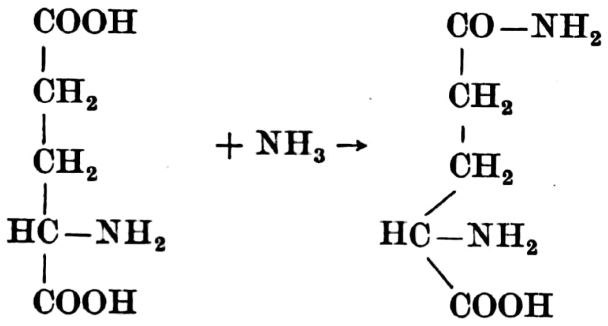
3. Sub acțiunea arginazei, arginina se transformă în uree și ornitină ; la sfârșitul reacției, ornitina se regăsește în aceeași concentrație ca la început ; are deci rol catalitic. Acest ciclu al reacțiilor e cunoscut sub numele de ciclul lui Krebs și Henseleit al ureoformării și se reprezintă schematic astfel :



Confirmarea acestei teorii a fost dată de experiențele cu C izotop încorporat bicarbonatului adăugat secțiunilor hepatice. C izotop este regăsit în ureea formată. Deasemenea, după hrănirea animalelor cu amoniac conținând ^{15}N, se regăsește azotul izotop în arginină, în gruparea amidinică și în uree. Acest ciclu ureogenetic a fost regăsit la *Neurospora* și de noi la o serie de germeni ca B. *antrax*, stafilococi, etc.

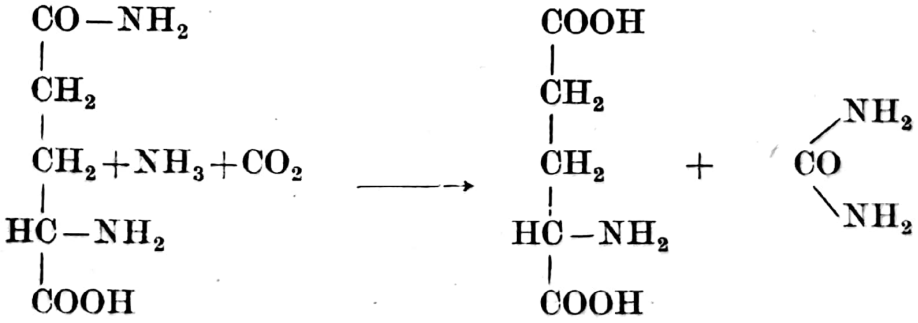
Formarea ureei din glutamină

O altă teorie a formării ureei prin intermediul glutaminei a fost formulată de Leuthard și apoi de Bach. El observă că la cobaii în inaniție, hrăniți cu *glutamină*, există o eliminare de uree mai mare decât aceea care ar corespunde acidului aminat corespunzător acesteia (acidul glutamic), deci are loc o eliminare și a funcției aminice din amină; eliminarea de uree nu e mărită în prezența ornitinei, deci ornitina nu intervine în formarea ureei din glutamină. Se crede că se formează direct, așa cum am văzut că se întâmplă pentru arginină, deși nu s'a putut izola în acest caz o enzimă. Nu se cunoaște mecanismul exact Bach crede că se formează din acidul glutamic, în ficat, prin următoarea reacție:



acid glutamic — glutamină

Din acidul glutamic se formează glutamina și, din aceasta, prin fixare de NH_3 și CO_2, din nou acid glutamic și uree:



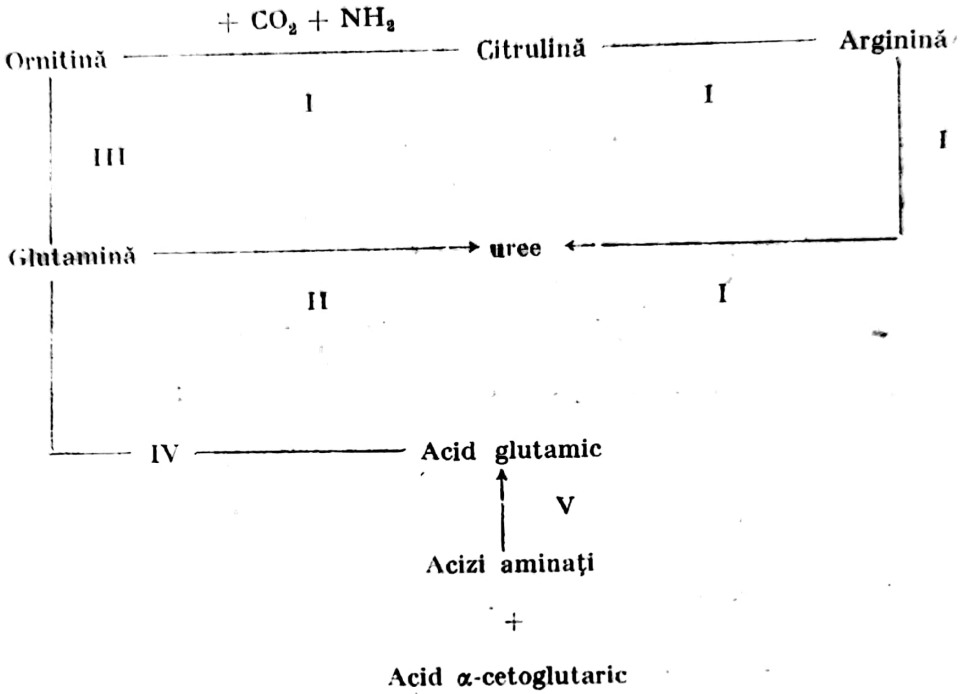
glutamină — acid glutamic — uree

E de observat că cele două amine, glutamina și asparagina, din care se formează ureea direct, corespund tocmai celor doi acizi aminați dicarbonici, glutamic și aspartic, care au un rol fundamental în degradarea și sinteza acizilor α-aminați. Prin intervenția acestor amine în formarea ureei s'ar complecta astfel întregul metabolism al N din proteine.

Scanned with OKEN Scanner

Intr'adevăr, se cunoaşte o transformare a acidului glutamic în glutamină la nivelul rinichiului (vezi formulele) şi se poate înlocui în experienţă glutamina cu acid glutamic şi NH_3 sau chiar cu acid α-glutaric şi amoniac. In legătură cu aceasta s'a emis ipoteza că ornitina ar trece direct în glutamină şi aceasta s'ar transforma în uree fără intervenţia argininei.

Se poate da o *schemă a teoriilor ureogenezei* în felul următor :



Amoniofanereza

Unul din produsele de eliminare ale N din organism este şi amoniacul, care are în clinică şi fiziologie un rol important. In sânge, cantitatea de amoniac e extrem de mică, 0,29 mg%, deci amoniacul din urină nu provine din amoniacul sanguin. Procesul de formare a amoniacului urinar a fost o problemă mult discutată. Nu există o acumulare de amoniac în sânge după nefrectomie, şi experienţele lui Nash şi Benedict au arătat că amoniacul din vena renală este de două sau trei ori mai crescut decât amoniacul din artera renală. In general, amoniacul din sânge nu este modificat când amoniacul urinar creşte. Aceste fapte au dus la interpretarea că amoniacul urinar se formează în rinichi din compuşi amoniogeni cum sunt glutamina şi aminoacizii. In rinichi există o desaminază foarte activă a acizilor α-aminaţi, deasemenea este prezentă o glutaminază care face hidroliza glutaminei. S'a observat că injecţii intravenoase cu acizi aminaţi, produc o creştere considerabilă a amoniacului din vena renală, în raport cu creşterea mică din artera renală. Deci în rinichi se formează amoniac din compuşii capabili de a-l forma.

Se numeşte *amoniofanereză* (faneros = eu apar) fenomenul de apariţie a amoniacului din substanţe amoniogene (fenomen secretor). Eliminarea acestui amoniac în urină (amoniouria) este un al doilea fenomen fiziologic excretor. Excreţia amoniacului în urină este în funcţie de acizii din organism care urmează a fi neutralizaţi şi eliminaţi sub formă de săruri de

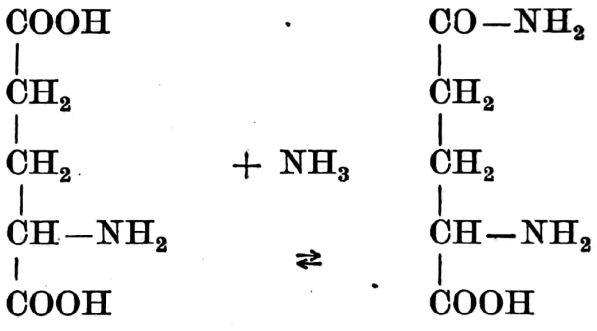
amoniu. Se ştie că amoniacul substitue ionii alcalini Na^+ şi K^+ în acizii minerali sau cetonici şi prin acest mecanism are un rol important în echilibrul acidobazic, eliberând aceşti ioni pentru neutralizarea altor acizi care apar în urma proceselor metabolice, fiziologice sau patologice. Intr'adevăr, s'a observat că eliminarea amoniacului în urină, amoniuria, creşte după ingestia de acizi. Este crescută în acidoză şi scăzută în alcaloză.

Au loc astfel două procese distincte, pe de o parte formarea amoniacului din substanţe capabile de a-l elibera şi, pe de altă parte, eliminarea lui în urină, pe măsura necesităţilor.

Am văzut că acizii α-aminaţi, şi în special acizii seriei *d*, sunt desaminaţi cu formare de amoniac. Sunt compuşii amoniogeni cei mai importanţi.

Amoniofanereza nu este exclusiv o funcţie renală; se regăseşte la nivelul pancreasului, glandelor salivare, intestinului, plămânului. Deoarece amoniacul este necesar pentru menţinerea echilibrului acido-bazic şi chiar pentru sinteza aminoacizilor şi cum amoniacul liber este toxic, este probabil că există o formă nenocivă de depozitare a acestuia.

Krebs constată că amoniacul ar reacţiona cu acidul glutamic formând glutamina, amida acestui acid, care ar constitui o formă de depozitare a amoniacului din care poate fi scindat printr'un proces enzimatic, atunci când este necesar.



acid glutamic — glutamină

Amoniofanereza, adică formarea NH_3 din compuşii amoniogeni, este independentă de amoniourie.

METABOLISMUL COMPONENTEI TERNARE

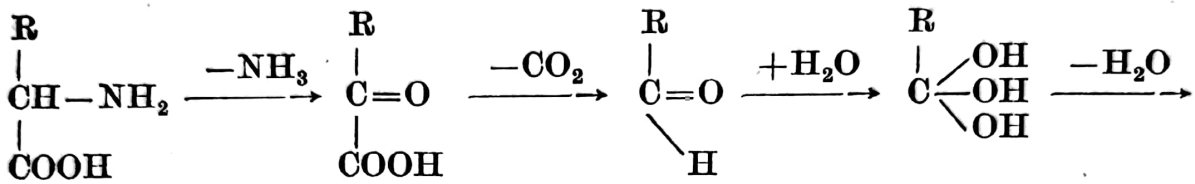
Am văzut care este soarta grupării aminice rezultate din desaminarea acizilor aminaţi. Cealaltă componentă, produsul ternar, cuprinde C, H, O; ea este degradată printr'un şir de procese intermediare în produsele finale CO_2 şi H_2O. Din desaminarea oxidativă rezultă, am văzut, ca o componentă ternară, *acidul cetonic*. După modul de degradare a acestuia, acizii aminaţi se împart în trei grupe:

1. **acizi aminaţi glucoplastici** sau glucoformatori, acizi a căror componentă ternară duce la formare de glucoză, respectiv de glicogen. Aceştia sunt: glicocolul, alanina, serina, treonina, acidul aspartic, acidul glutamic, arginina, prolina, ornitina, cistina, cisteina, valina, hidroxiprolina;
2. **acizi aminaţi cetoplastici** sau cetoformatori, a căror componentă ternară duce la formare de corpi cetonici. Aceştia sunt leucina, tirozina, izoleucina, fenilalanina;

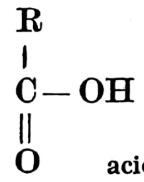
3. acizi aminați agluco- și acetoplastici: triptofanul, lizina, metionina, histidina. Nu se știe cu precizie calea de trecere dela acizii aminați la glucoză sau cetonă.

Acizii cetonici rezultați din desaminarea unor acizi aminați pot fi identici chiar cu unele produse intermediare din degradarea glucidelor. De exemplu, alanina, prin desaminare, dă drept componentă ternară acidul piruvic, ceeace explică faptul că poate intra în ciclul de formare a glucozei.

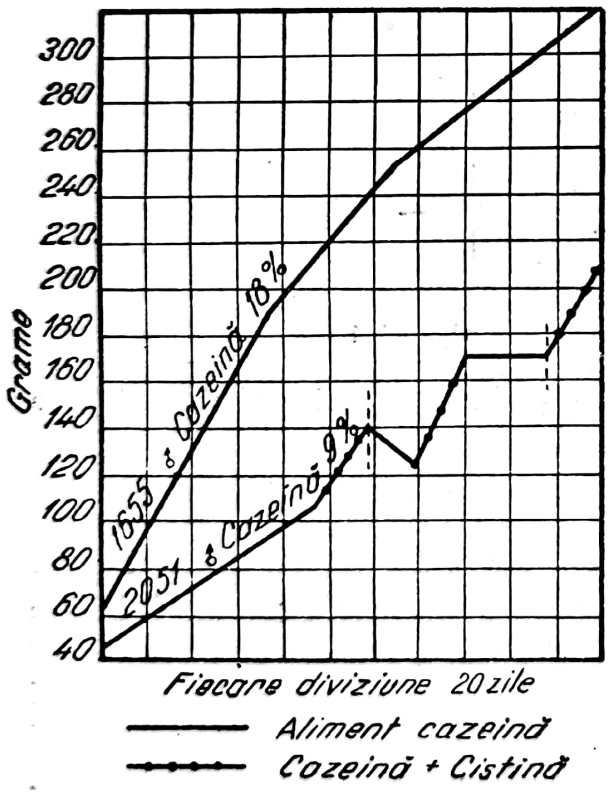
Formarea corpilor cetonici se poate explica deasemenea prin oxidarea acizilor cetonici (corespunzători aminoacizilor) în acizi grași cu un atom de carbon mai puțin decât acidul aminic corespunzător. Or, se știe că acizii grași cu un număr pereche de carbon dau prin β-oxidare corpi cetonici. Astfel:



aminoacid — acid cetonic — aldehidă — aldehidhidrat



acid gras → corp cetonic



Alimentația conținând 18% cazeină ca singură sursă proteinică accelerează creșterea șobolanului. Cazeina 9% în alimentație modifică mult mai puțin creșterea animalului. Adăugând cistină alimentației care conține 9% cazeină se accelerează creșterea. Suprimarea și adăugarea alternantă de cistină produc paralel încetinire sau accelerarea creșterii

Fig. 107. Acțiunea cazeinei și respectiv a cistinei asupra creșterii șobolanului.

Aminoacizi esențiali și neesențiali

Aminoacizii aduși cu proteinele alimentare sunt necesari sintezei proteinelor din țesuturi în timpul creșterii și continuei regenerări a proteinelor tisulare, precum și pentru formarea hormonilor, enzimelor, purinelor, sărurilor biliare, creatinei, etc., componente obligatorii în celula vie.

Din experiențele făcute pe animalele alimentate cu acizi aminați ca singură sursă de azot, precum și pe animale alimentate cu un regim mixt cuprinzând glucide, lipide, vitamine, săruri minerale și acizi aminați izolați, se constată o serie de fapte foarte importante în ceeace privește obligativitatea aportului din afară a fiecărui acid aminat în parte (fig. 107). Din cei 22 de acizi aminați care intră în structura proteinelor, 9 aminoacizi nu trebue să

lipsească din alimentaţie. Aceştia sunt : *valina, leucina, izoleucina, lizina, treonina, metionina, fenilalanina, histidina, triptofanul.* Aceşti acizi aminaţi sunt esenţiali sau *indispensabili*, deoarece organismul animal nu-i poate sintetiza. Această serie cuprinde acizi aminaţi cu nucleu ciclic sau heterociclic (benzenic-fenil-alanina, iminazolic-histidina), indicând deci absenţa unei ciclopoeze în organism, apoi acizi aminaţi cu funcţii asociate, alcooli (treonina), tiol (metionina), apoi acizi aminaţi cu catenă ramificată (valina, leucina, izoleucina). Acizi aminaţi *parţial indispensabili sunt : cistina, tirozina, arginina, glicocolul.*

Toţi *aminoacizii neesenţiali sunt glucogènici*, deci transformarea lor în glucide este reversibilă.

Toţi *aminoacizii cetogenici sunt esenţiali*, adică nu pot fi sintetizaţi de organismul animal, indicând astfel că transformarea lor în corpi cetonici este un proces ireversibil. Unii din aminoacizii esenţiali sunt şi glucogenici, deci unele din etapele de transformare în glucide sunt ireversibile.

Acizii aminaţi dispensabili din alimentaţia animalului, adică acei acizi aminaţi care pot fi sintetizaţi în organism, sunt : alanina, norleucina, citrulina, serina, acidul asparagic, acidul glutamic, acidul oxiglutamic, oxiprolina. S'a arătat că triptofanul este un acid aminat absolut indispensabil pentru menţinerea greutăţii corporale, deasemenea cistina şi histidina ; lizina e absolut indispensabilă creşterii animalului tânăr. Este probabil că alţi acizi aminaţi intervin în păstrarea altor funcţii, de exemplu reproducerea, mecanismele de desintoxicare, etc. Cercetările asupra culturilor de ţesuturi arată că unii acizi aminaţi au acţiune stimulentă (glicocolul, triptofanul, prolina), alţii acţiune inhibantă (lizina, cistina, histidina), iar alţii sunt inactivi (leucina, valina, alanina).

Se poate reprezenta schematic :

Proteine ⇄ aminoacizi → neesenţiali ⇄ glucide
aminoacizi → esenţiali → corpi cetonici

Studiile asupra rolului acizilor aminaţi în organism sunt importante şi din punct de vedere practic. Astfel, albuminele din cereale, care nu cuprind toţi acizii aminaţi indispensabili, cum ar fi zeina din porumb (fig. 108) (care nu conţine triptofan şi lizină), sau gliadina din grâu, care nu conţine lizină, constitue fiecare un aliment incomplect, au valoare biologică mică. Prin ele însile nu pot asigura o creştere normală a fiinţelor vii, tinere, deaceea acestor proteine incomplecte trebue să li se adauge proteine complecte, cum sunt cazeina din lapte sau

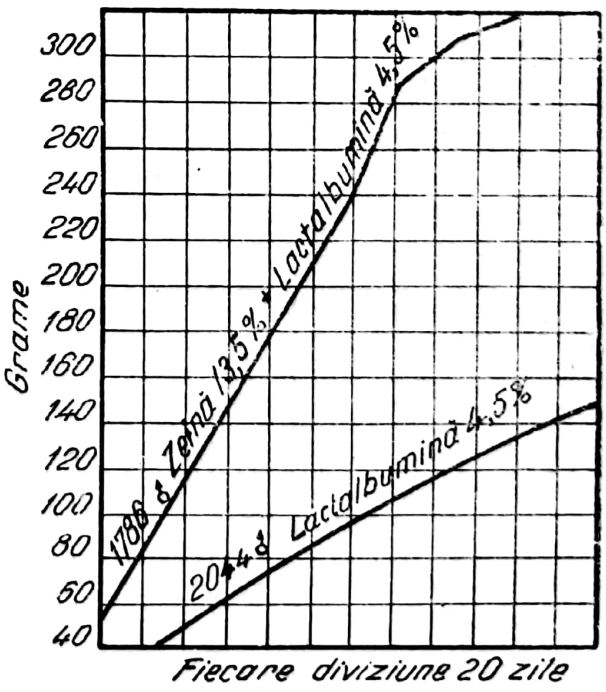


Fig. 108. Influenţa zeinei şi a lactalbuminei asupra creşterii şobolanului.

ovalbumina din ou. Proteinele constitue astfel o alimentație indispensabilă tocmai datorită aminoacizilor indispensabili pe care îi conțin. Aminoacizii esențiali și neesențiali sunt necesari pentru numeroase procese în formarea enzimelor, hormonilor (adrenalina, tiroxina, insulina).

Alte căi de degradare a acizilor aminați

Decarboxilarea acizilor aminați

Acizii aminați pot fi decarboxilați în intestin sub acțiunea bacteriilor intestinale cu formare de amine, așa numitele ptomaine:

$$R-\underset{\displaystyle COOH}{\overset{\displaystyle NH_2}{CH}} \rightarrow R-CH_2-NH_2 + CO_2 \rightarrow$$

Ornitina dă naștere prin decarboxilare la tetrametilendiamină sau putresceină, lizină, la pentametilendiamină sau cadaverină:

$$H_2N-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2;$$

putresceină

$$H_2N-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$$

cadaverină

Desaminarea acizilor aminați sub acțiunea bacteriilor intestinale poate duce, pentru acizi aminați cu nucleu benzenic, la crezoli și fenoli.

Din triptofan se pot forma scatol și indol.

Aceste produse de descompunere sunt eliminate prin fecale, dar pot uneori să fie absorbite în circulație și unele din ele pot contribui la producerea unor grave intoxicații.

Formarea aminelor biogene cu caracter hormonal, ca tiramina, histamina, este importantă. In celule poate avea loc o decarboxilare a acizilor aminați, având ca rezultat producerea acestor amine. *Tiramina* rezultă din decarboxilarea tirozinei, iar *histamina* din decarboxilarea *histidinei*; sunt substanțe care am văzut că au un rol fiziologic important.

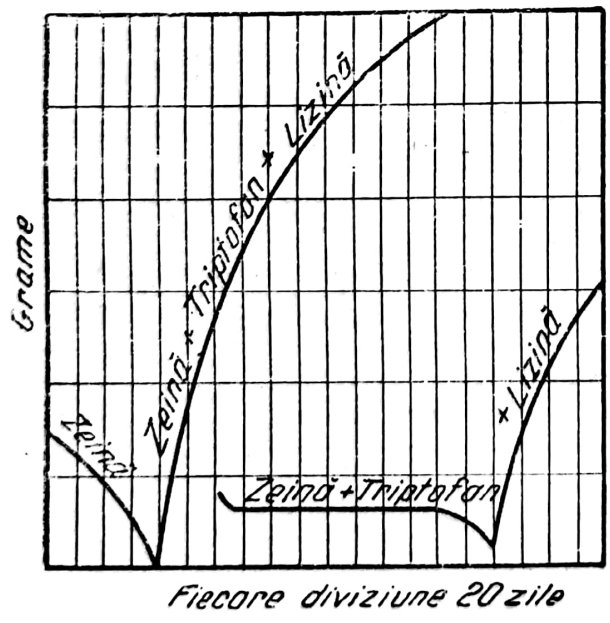


Fig. 109. Necesitatea lizinei pentru creștere

Transpeptidarea proteinelor

In afară de degradarea proteinelor în produsele finale există și o transformare a proteinelor care nu se face printr'o degradare totală și ulterior o sinteză complectă, ci, probabil, printr'un schimb al acizilor aminați din molecula proteinei. Exemplul cla-

sic al unei asemenea transformări a proteinelor în alte proteine este transformarea proteinelor musculare în proteine ale glandelor sexuale la peştele *Lechs*. Acest peşte migrează primăvara dinspre mare în apele dulci şi în acest timp are o musculatură bine desvoltată şi glandele sexuale nemature. Timp de 6—10 luni nu se hrăneşte deloc; totuşi, în acest interval, glandele sexuale se maturează, ovarul şi testiculii devenind enormi (ovarul creşte dela 60 — 100 la 1 800—2 000 g). Proteinele necesare acestei creşteri nu pot fi luate decât din alte organe şi în special din muşchiul striat, care scade cu 40% din greutate. Protamina din aceste organe sexuale, *clupeina*, conţine multă arginină (90%), pe când musculatura numai 5—6%; trebue deci o mare cantitate de proteine musculare pentru a forma proteinele din glandele sexuale. In acest proces a avut loc deci un schimb în constituenţii unui tip de proteine cu realizarea unui alt tip de proteină, în care proporţiile acizilor aminaţi sunt diferite.

Experienţe recente făcute cu compuşi care conţin atomi izotopi ^{15}N, ^{18}O, ^{2}H (D) au permis să se urmărească transformările pe care le pot suferi aceşti compuşi în organism şi ele au confirmat existenţa unei transformări a proteinelor unele în altele, transformare care constă într'un schimb între elementele constituente ale moleculei proteinice. Acest schimb a fost numit transpeptidare. In special experienţele lui Schoenheimer şi Rittenberg sunt foarte interesante. Dacă se hrănesc animale (guzgani) cu *l*-leucină care conţine izotopi ^{15}N şi ^{2}H (D) şi se cercetează eliminarea ^{15}N în fecale şi urină, pe de o parte, şi prezenţa ^{15}N în proteinele din organism, pe de alta, se constată după câteva zile că 5—8% din ^{15}N se găsesc în proteinele din organism, 30% în însăşi leucina din proteine, datorită deci transpeptidării, iar 70% în alţi acizi aminaţi, rezultaţi prin transaminare. Nu s'a putut observa pentru lizină o transpeptidare; se pare că e singurul acid aminat care scapă acestui proces.

Utilizând aminoacizi cu izotopi se constată o încorporare a ^{15}N în proteine e plasmatice şi în proteinele din ficat, rinichi, tract intestinal, mai lent în proteina hemoglobinei; N este în continuu schimb între diversele ţesuturi ale căror constituente sunt în echilibru dinamic. *Metabolismul proteinic este un mecanism dinamic în care degradarea şi sinteza sunt corelate, azotul din alimentaţie înlocuind azotul din ţesuturi şi organe, iar azotul diverselor organe suferind la rândul lui continue modificări.* Experienţele cu izotopi au pus în evidenţă starea de echilibru dinamic în care se găsesc constituenţii organismului. Aproape toţi aminoacizii fixează ^{15}N (azot greu) dar acidul glutamic este acela care îl fixează cel mai mult şi pentru care, deci, schimbul grupării NH_2 este mai important. Folosirea apei grele arată că 80% din moleculele acidului glutamic din ficat suferă în 24 de ore o reacţie reversibilă de dehidrogenare-hidrogenare. Acest lucru se datoreşte faptului, că acidul glutamic are în organism enzime specifice foarte active, ceeace explică locul special pe care îl ocupă acest aminoacid în metabolism.

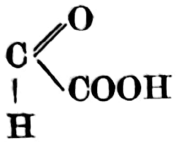
METABOLISMUL SPECIAL AL UNOR AMINOACIZI

Procesul comun de degradare al tuturor aminoacizilor naturali este desaminarea. O serie de aminoacizi au însă şi căile lor proprii de degradare. Vom descrie pentru fiecare caz în parte care sunt aceste căi.

Scanned with OKEN Scanner

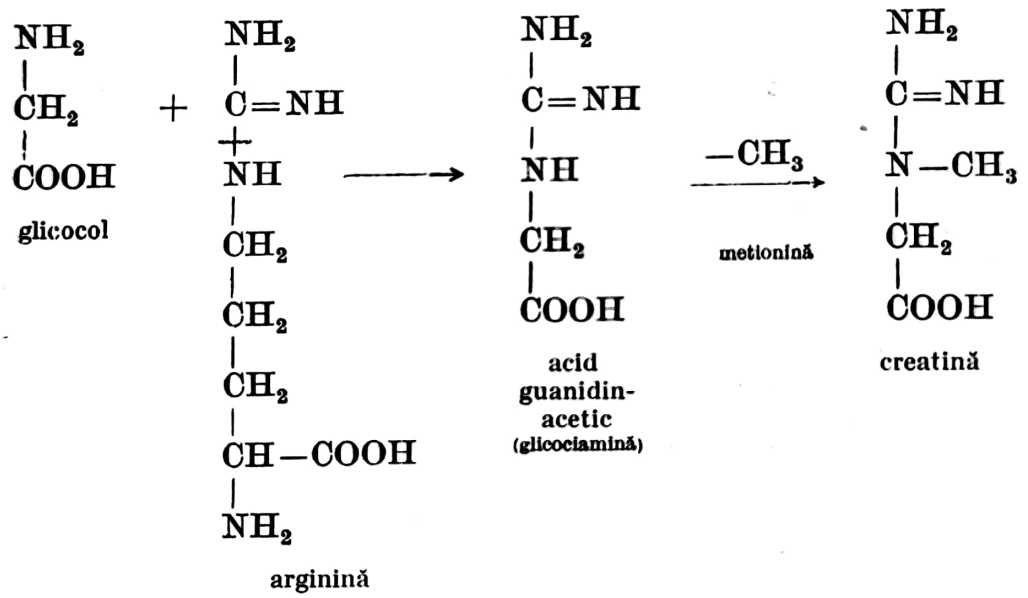
Glicocolul H_2N-CH_2-COOH, *neesențial și glucogenic.*

Glicocolul poate fi sintetizat în organism, deci este un aminoacid dispensabil. Ia parte la o serie de funcții metabolice. Este o componentă a multor proteine; colagenul, de exemplu, este foarte bogat în glicocol. Prin desaminare, sub acțiunea specifică a glicocoloxidazei, trece în acid glioxilic:



Formează doi derivați metilați, sarcozina (monometilglicocol) și glicocolbetaina (trimetilglicocol). Este o componentă a multor compuși neproteinici, ca de exemplu: acidul glicocolic din ficat, glutationul din celule, acidul hipuric din urină; acesta din urmă este forma de eliminare prin urină a glicocolului cuplat cu acidul benzoic (joacă astfel un rol important în *detoxificarea acizilor aromatici*, fenilacetic, nicotinic). Glicocolul intervine în *biosinteza creatinei* împreună cu arginina și metionina. Etapele formării creatinei ar fi următoarele:

1. formare de acid guanidinacetic (glicociamina) printr'un proces de transguanidilare, rezultat din acțiunea glicocolului asupra argininei;
2. metilare sub acțiunea metioninei cu formare de creatină, care nu este decât acid metilguanidinacetic:



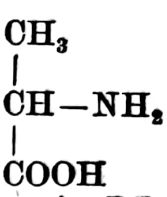
Metilarea prin intervenția metioninei se face la nivelul ficatului. Prin experiențe cu glicocol și arginină conținând N izotop s'a demonstrat că cei doi atomi din porțiunea amidinică a creatinei — $C(=NH)(NH_2)$ derivă din porțiunile amidinice ale argininei, iar cel de al treilea azot, din glicocol; formarea acidului guanidinacetic o face țesutul renal, iar țesutul hepatic sintetizează din acest acid creatina în prezența metioninei; acest din urmă fapt a fost dovedit utilizând metionina cu hidrogen izotop la gruparea metilică; izotopul e regăsit în creatina formată.

Glicocolul intervine direct în sinteza glutationului, fapt dovedit deasemenea prin hrănirea animalelor cu glicocol conținând atomi izotopi. Tot prin acest procedeu s'a pus în evidență participarea acestui amino-

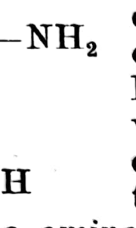
acid la sinteza hemului, respectiv a inelului pirolic din molecula hemoglobinei.

Glicocolul este un aminoacid glucoformator, deoarece, administrat la diabetici, sau la animale florizinice, duce la o creştere a eliminării glucozei din urină.

Alanina aminoacid *neesenţial, glucoformator.* Se găseşte sub forma β

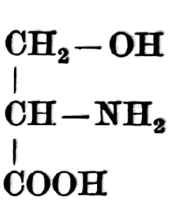


D(−) şi *L*(+). Prin sinteză în laborator rezultă produsul racemic *DL*. β-alanina este singurul aminoacid cu forma β



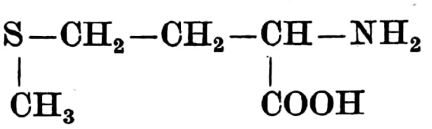
din dipeptidele carnozina şi anserina, din vitamina B — acidul pantotenic. Prin desaminare, trece în acid piruvic, componentă a ciclului de degradare a glucidelor, ceeace explică caracterul ei glucoformator..

Serina



Serina aminoacid *neesenţial, glucogenic,* a fost izolată din hidrolizatele cazeinice sub forma fosfoserinei. Prin înlocuirea grupei OH cu SH, trece în cisteină. Serina ar participa electiv la sinteza glicocolului.

Metionina

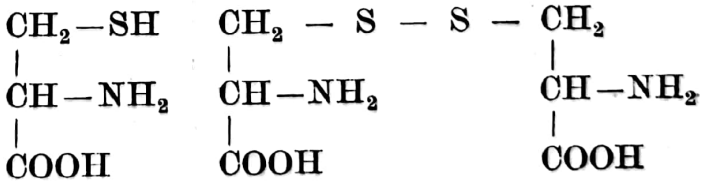


aminoacid *esenţial, aglucogen* şi *acetogen.*

Metionina este un aminoacid *indispensabil*; nu poate fi sintetizată în organism din componentele obişnuite ale alimentaţiei; este necesar creşterii animalelor tinere şi menţinerii echilibrului azotat la adult. O funcţie metabolică foarte importantă a metioninei este aceea de metilare. Organismul animal nu poate sintetiza grupările metilice necesare sintezei anumitor compuşi, ca de exemplu creatina. Metionina, colina şi betaina sunt sursele acestor grupări metilice; dintre acestea, cantitativ cea mai importantă sursă este metionina. Procesul de transfer al grupării metilice am văzut că are numele de *transmetilare*, iar gruparea metilică capabilă de a fi transferată are numele de „grupare metilică labilă"; se pare că numai grupările metilice fixate fie la N, fie la S pot să fie labile.

Metionina ar mai juca un rol de apărare în intoxicarea ficatului cu tetraclorură de carbon, fosfori, arsenic, cloroform. Degenerescenţa grăsoasă datorită absenţei colinei poate fi înlăturată prin metionină. Prin demetilare aceasta trece în homocisteină $SH-CH_2-CH_2-CH.NH_2-COOH$.

Cistina şi cisteina



cisteină cistină

Cistina, esenţial şi glucogenic, cisteina esenţial, dar înlocuibil prin metionină.

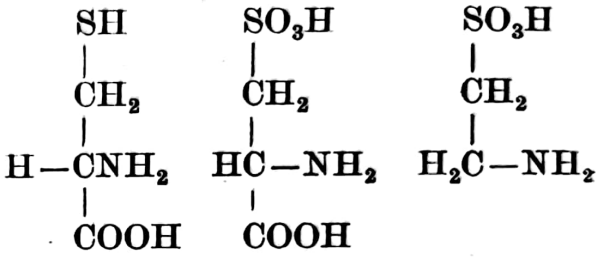
Sunt aminoacizii cu sulf în moleculă; pot fi înlocuiţi în organism prin metionină, fapt controlat prin utilizarea ^{33}S izotop. Metionina cu ^{33}S provoacă eliminare de cistină conţinând ^{33}S.

Scanned with OKEN Scanner

Sus: şobolan după 28 zile de alimentaţie lipsită de valină şi acelaş animal după 25 zile de aport de valină *(Ios)*.

Fig. 110-A.. Acţiunea valinei.

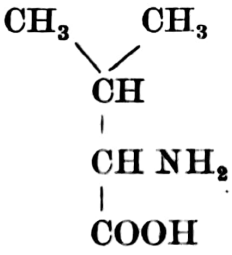
Cistina şi cisteina intră în structura unor importanţi compuşi cu sulf din organism. Cisteina e o componentă a glutationului; pare să fie precursorul acizilor biliari, respectiv al taurinei din acidul taurocolic din bilă, probabil printr'o oxidare intermediară în acid cisteinic:



cisteină — acid cisteic — taurină

Cisteina este *glucogenică*; administrată unui organism cu diabet florizinic, are loc o eliminare de glucoză. In anumite cazuri patologice, rare, de cistinurie există o eliminare de cistină în urină sub forma de cristale.

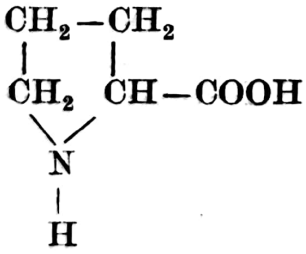
Valina



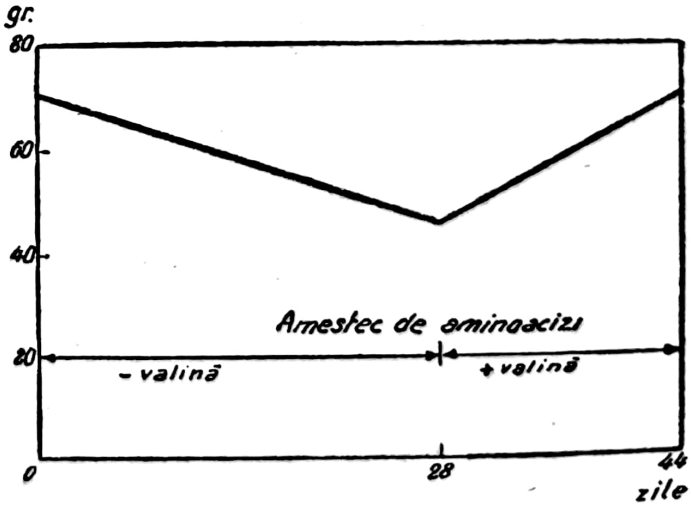
esenţial şi *glucogenic*. In fig. 110 se vede acţiunea valinei asupra animalelor tinere.

Leucina, izoleucina nu sunt sintetizate în organismul animal. Sunt necesare creşterii animalelor tinere şi menţinerii echilibrului azotat la adult. Sunt *cetogene*. Norleucina, neesenţial, nu ar apărea în proteine.

Prolina



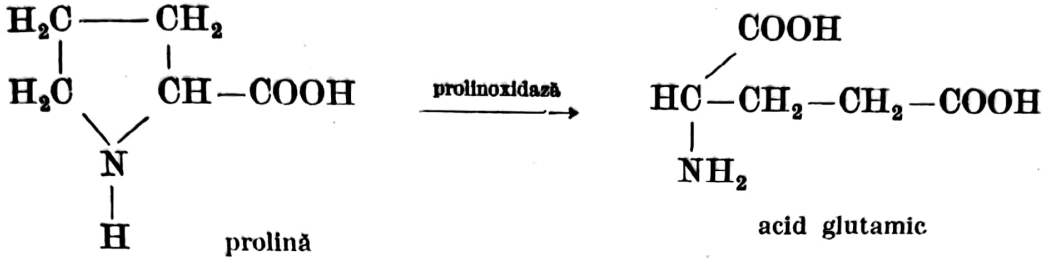
aminoacid *neesenţial*, *glucogenic*. Poate fi sintetizată în organismul animal; se crede că ornitina este precursorul ei, fapt dovedit cu ajutorul ornitinei marcate cu deuteriu**m. Ar fi posibilă şi o trans**formare din acid g'utamic, dar faptul nu a fost dcmons-



B. curba greutăţii

Fig. 110-B.

trat. In schimb s'a demonstrat formarea acidului glutamic din prolină. Prolinoxidaza renală poate deschide ciclul prolinic cu formare de acid glutamic:

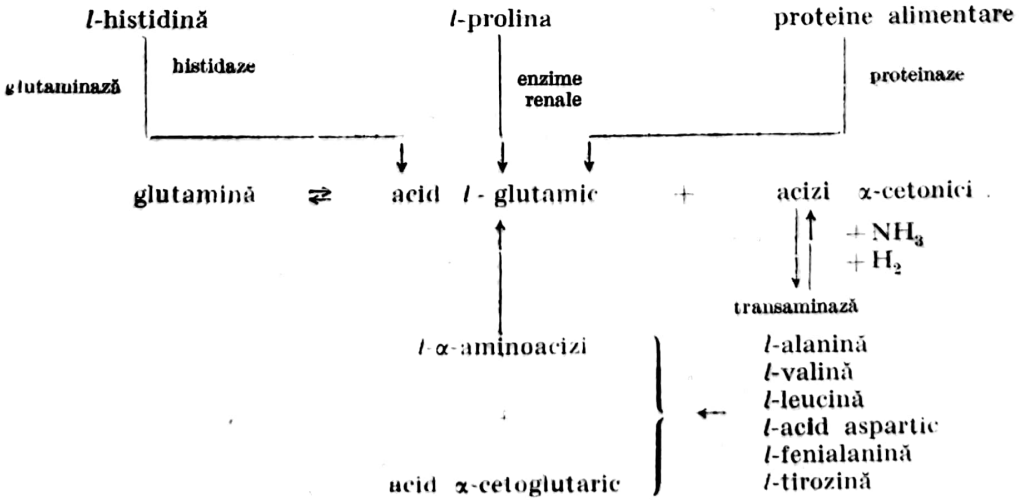


Este probabil, că datorită acestei transformări, prolina este glucogenică.

In organism deci prolina poate suferi (cu formare de amoniac, respectiv uree) o transformare în hidroxiprolină şi în acid glutamic; se pot transforma unul într'altul.

Acidul glutamic $HC(COOH)(NH_2)-CH_2-CH_2-COOH$ este aminoacidul dicarboxilic prezent în proteinele vegetale şi animale. Este sintetizat cu uşurinţă în organismul animal, e deci *dispensabil* din alimentaţie. Este un intermediar important în metabolismul general azotat. Poate avea origini diverse, lucru foarte important, având în vedere rolul central al acestui aminoacid în metabolismul general al aminoacizilor, după cum rezultă din procesul de transaminare, descoperit de Braunştain şi Criţman. In afară de transaminare, acidul glutamic poate suferi o desaminare oxidativă reversibilă:

Acid glutamic $\rightleftarrows$ α-acid cetoglutaric + NH_3, reacţie reversibilă de sinteză; este una din puţinele reacţii cunoscute ale unei sinteze biologice a unui aminoacid dintr'un cetoacid şi amoniac. Acidul glutamic este *glucogenic* datorită formării de acid α-cetoglutaric, care ştim că este un intermediar în metabolismul glucidic. Acţiunea glucogenică a altor aminoacizi, ca prolina, ornitina, histidina, se explică prin posibilitatea de a forma acid glutamic. Astfel, căile de formare a acidului glutamic sunt următoarele:

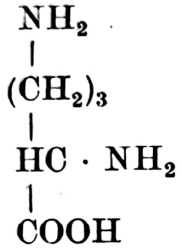


Acidul glutamic este o componentă a acidului folic, vitamina pteroil-glutamică (celelalte două componente fiind acidul p-aminobenzoic şi acidul pteroic). Acidul glutamic este folosit în sinteza glutationului.

Prezenţa în ţesuturile canceroase a *d*-acidului glutamic, aşa cum s'a afirmat, nu a putut fi însă confirmată; prezenţa acestuia în capsula *B. antrax* şi a unor substanţe de origină bacteriană a putut fi pusă în evidenţă.

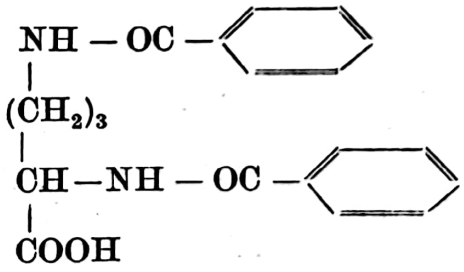
Acidul aspartic $HOOC-CH_2-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH$ ar avea un rol oarecum similar cu acidul glutamic, dar nu atât de extins. Am văzut că aceşti aminoacizi dicarboxilici au un rol esenţial în procesul de aminare, desaminare şi transaminare, precum şi în acela de inversiune a aminoacizilor

Ornitina



Prin desaminare şi transaminare trece în acid oxaloacetic; prin decarboxilare, sub acţiunea unei decarboxilaze din ficat, e transformat în acid piruvic. Cu amoniacul, sub acţiunea asparaginazei, trece în asparagină, amida corespunzătoare.

Ornitina, aminoacid *neesenţial* şi *glicogenic*, nu ar fi izolat din hidrolizatele proteinice. Participă la ciclul ornitinic. La păsări ar avea rolul de detoxificare a acizilor aromatici, ca acidul benzoic, cu care formează acidul orniturie:

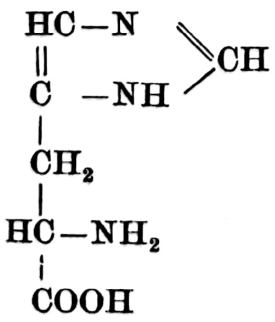


acid orniturie

Prin decarboxilare trece în putresceină: $NH_2-(CH_2)_4-NH_2$.

Lizina, *aminoacid esenţial, necetogen şi neglicogen* Nu este desaminat în organism. Sub acţiunea enzimelor bacteriene trece în cadaverină: $H_2N-(CH_2)_5-NH_2$.

Histidina



Histidina e un aminoacid relativ indispensabil din alimentaţia animalelor tinere, probabil datorită prezenţei inelului iminazolic, care e nereproductibil. Inelul este necesar formării purinelor şi nucleoproteinelor. Este capabil de transaminare şi reaminare.

Catabolismul histidinei trece probabil prin stadiul de acid glutamic după desfacerea inelului iminazolic. Histidina, prin decarboxilare sub acţiunea unei enzime, trece în amina corespunzătoare, *histamina*. Acest proces poate avea loc în intestin, sub acţiunea bacteriilor intestinale, în ţesuturile distruse

Scanned with OKEN Scanner

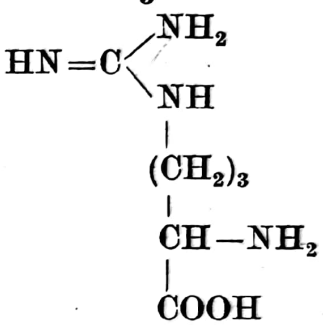
sau lezate şi în cele normale. Histamina are rol fiziologic de bază. Se găseşte în ţesutul muscular şi sub formă de carnozină (β-alanil-histidină). Se găseşte în mod obişnuit în urină în timpul sarcinii.

La câine, ingerarea de histidină duce la apariţia în urină a unui compus caracteristic, acidul urocanic (acidul iminazilacrilic) (vezi formulele).

Histidina este *glucogenică* probabil tot datorită transformării în acid glutamic în cursul metabolismului său.

Caracterul esenţial al histidinei este dat de nucleul iminazolic, care nu poate fi sintetizat de organism. Intr'adevăr, după administrare de azot greu ^{15}N sub formă de amoniac, se constată prezenţa ^{15}N numai în gruparea α-aminică a moleculei, nu şi în ciclul iminazolic. Izomerul natural *l* al histidinei poate suferi, am văzut, procesul de transaminare şi reaminare; izomerul nenatural *d* poate fi şi el folosit în anumită măsură — dar numai după transformarea lui în forma *l*: alimentarea şobolanilor cu *d*-histidină duce la o creştere a izomerului *l*, fapt care demonstrează net capacitatea organismului de a realiza inversiunea unui aminoacid. Mecanismul exact nu se cunoaşte.

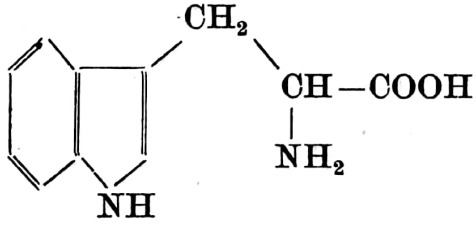
Arginina



Arginina poate fi sintetizată de ţesuturile tinerelor animale în creştere, dar în cantitate insuficientă, este deci în acest sens *indispensabilă*. Este *glucogenică*.

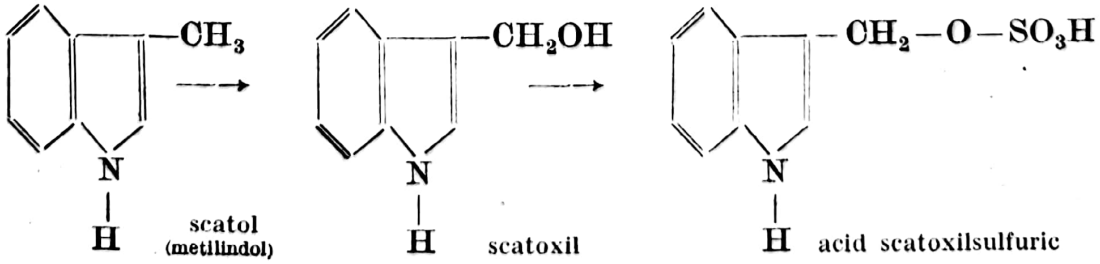
Are un rol important în sinteza creatinei. Rolul argininei în sinteza ureei a fost deasemenea relatat anterior. Poate participa la transamidinare. Constitue fosfagenul nevertebratelor. Pe calea ornitinei, prolinei, hidroxiprolinei, poate duce la formare de acid glutamic.

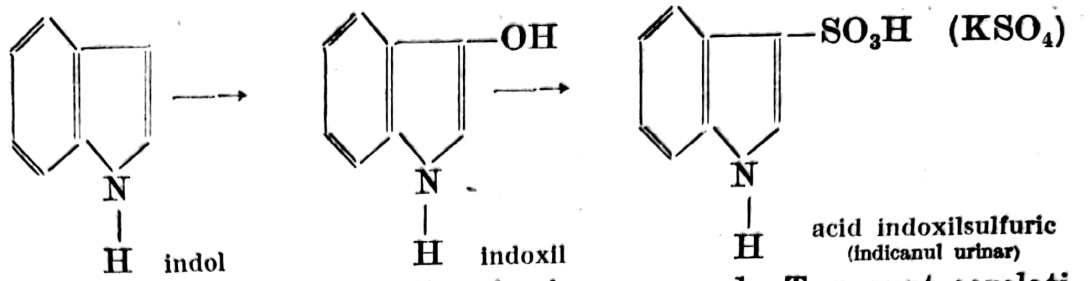
Triptofanul



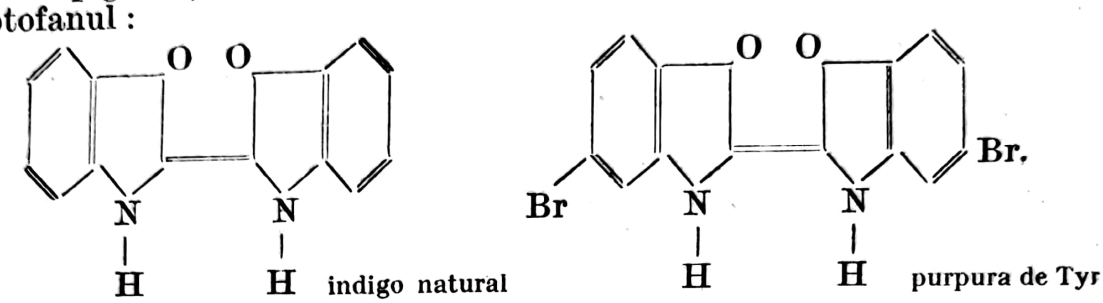
este un aminoacid *indispensabil* din alimentaţie, este *agluco-* şi *acetoplastic*. Triptofanul este unica sursă de nucleu indolic. Este necesar creşterii animalelor tinere şi menţinerii echilibrului azotat la adult. Are diverse căi de metabolizare care ar varia cu specia animală. Una din ele ar fi aceea de transformare în acid chinurenic. La câini, alimentaţia cu triptofan duce la formarea acestui compus, prin stadiul intermediar de chinurenină. La om, chinurenina este degradată fără a forma nucleul heterociclic până la acid chinurenic. Se crede că acidul chinurenic este un produs intermediar în metabolismul triptofanului, capabil de a fi utilizat numai de anumite specii.

Triptofanul sub acţiunea bacteriilor intestinale, se transformă în *scatol* şi *indol*, care pot fi transformaţi biologic în alcoolii corespunzători, indoxilul şi scatoxilul. Aceştia pot fi detoxificaţi prin conjugare cu acid sulfuric.





Doi pigmenți naturali, indigoul, și purpura de Tyr, sunt corelați cu triptofanul :



La mamifere, prezența scatolului și indolului în urină este datorită unei resorbții digestive; nu sunt metabolizați, ci sunt secretați în urină sub formă conjugată cu acidul sulfuric sau glicuronic. Sunt produse de putrefacție intestinală.

Fenilalanina și tirozina reprezintă doi aminoacizi aromatici, ale căror metabolisme se examinează împreună din cauza relației strânse dintre ele. Fenilalanina nu poate fi sintetizată de organismul animal (nucleul benzenic). Este un aminoacid *esențial*. Tirozina poate fi însă înlocuită în alimentație prin fenilalanină. Cu ajutorul izotopilor (deuterium) s'a dovedit sinteza tirozinei din fenilalanină, dar nu și invers. Ambele sunt componente esențiale ale proteinelor din organism și sunt implicate în formarea unor substanțe fiziologice importante, ca tiroxina, adrenalina, pigmenții melanici, etc. Sunt cetogenice, dar nu glucogenice.

Cunoștințe mai ample asupra metabolismului tirozinei au fost posibile datorită unui metabolism anormal al acestei componente, care duce la *alcaptonurie* excreție de acid homogentizinic (alcapton) — acid 2,5-dihidroxifenilacetic — în urină. Alcaptonuria este o boală congenitală și ereditară. In prezența alcalilor și oxigenului, acidul homogentizinic formează un pigment brun-negru, care colorează urina. Prezența acestui acid indică faptul că desaminarea tirozinei se face pe cale oxidativă și nu hidrolitică.

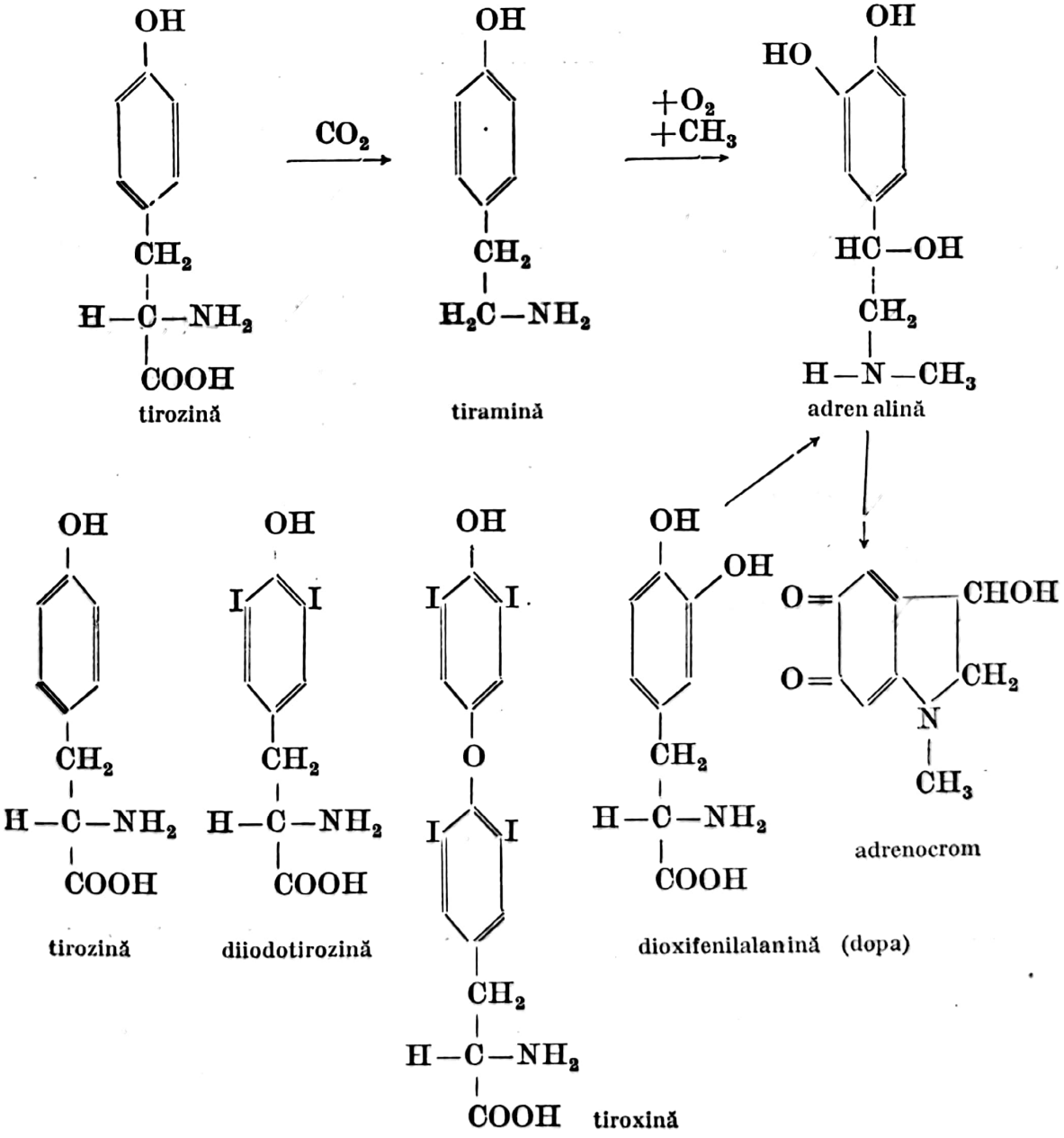
Organismul normal este capabil de a oxida complect acidul homogentizinic. Se poate provoca alcaptonurie artificială la om și animal prin hrănirea lor cu cantități excesive de tirozină sau de fenilalanină. Acest fapt ar indica apariția acidului homogentizinic ca produs intermediar în catabolismul acestor aminoacizi, produs care în organismul animal este oxidat. Administrarea de vitamină C corectează alcaptonuria cobaiului scorbutic, dar nu pe aceea umană.

Există o formă specială de deficiență mintală, „*oligofrenia fenilpiruvia*", în care are loc o excreție de acid fenilpiruvic în urină. Administrarea de fenilalanină indivizilor suferind de această boală produce o creștere a excreției de acid fenilpiruvic, ceeace dovedește că origina lui este fenilalanina. In această boală se pare că există o turburare a capacității de transformare a fenilalaninei în tirozină.

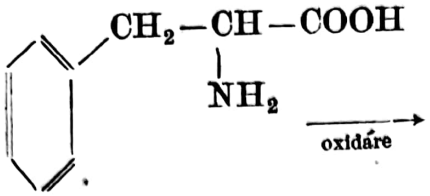
Scanned with OKEN Scanner

Alte aspecte importante ale metabolismului tirozinei sunt: formarea de *diiodotirozină*, de *tiroxină* şi de *adrenalină*. Din decarboxilarea tirozinei rezultă tiramină; din oxidarea şi metilarea acesteia, adrenalina, care se mai poate forma şi prin intermediul dioxifenilalaninei.

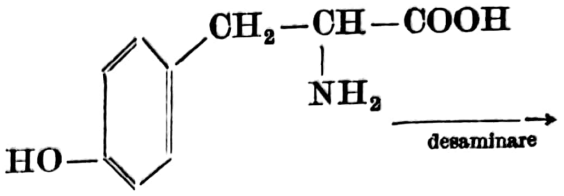
Deasemenea, *melanina* este legată de metabolismul tirozinei. Melanina este un amestec de pigmenţi; este un pigment normal al pielei şi e scăzut sau absent în aşa numitul albinism. Apare în cantităţi excesive în cancer şi poate fi astfel excretat în urină („melanurie"). E produsă deasemenea în cantităţi excesive în boala lui Addison. S'a dovedit că pielea conţine o enzimă, „dopaza", capabilă de a transforma „dopa" (3—4-dihidroxiphenilalanină) în compuşi melanici şi că această enzimă ar fi absentă în pielea albinoşilor. Precursorul probabil al 3,4-dihidroxifenilalaninei ar fi tirozina, care este oxidată în piele de către dopaoxidază, în melanină. Compoziţia acesteia din urmă nu se cunoaşte, Conţine nucleul indolic. Prin decarboxilarea tirozinei se obţine tiramina, amina, corespunzătoare; aceasta ar fi un precursor al adrenalinei.



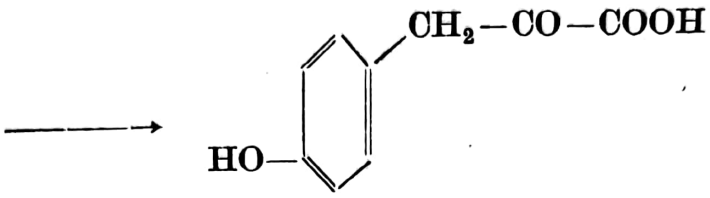
Formarea acidului homogentizinic



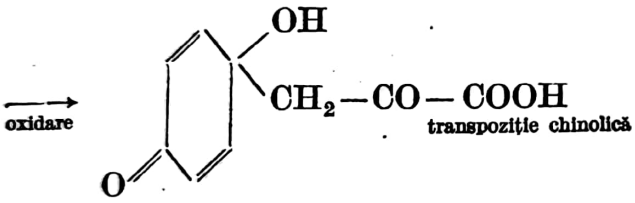
fenilalanină



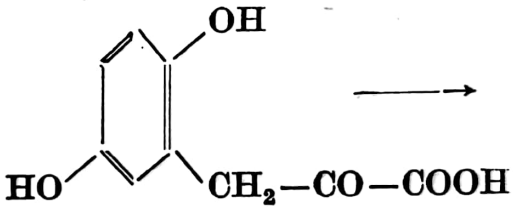
tirozină



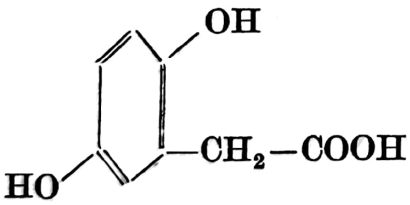
acid p-oxifenolpiruvic
(acid hidrochinonacetic).



chinol



acid 2,5-dioxifenilpiruvic



acid homogentizinic

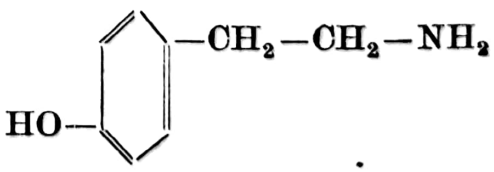
Amine derivate din acizi aminați

$H_2N-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$;

putrescină

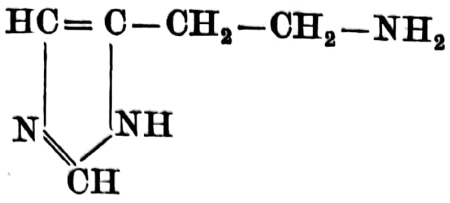
$H_2N-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$;

cadaverină

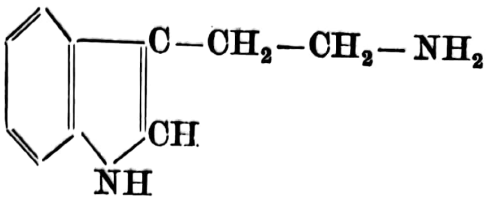


tiramină

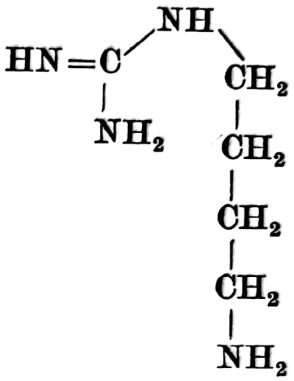
Scanned with OKEN Scanner



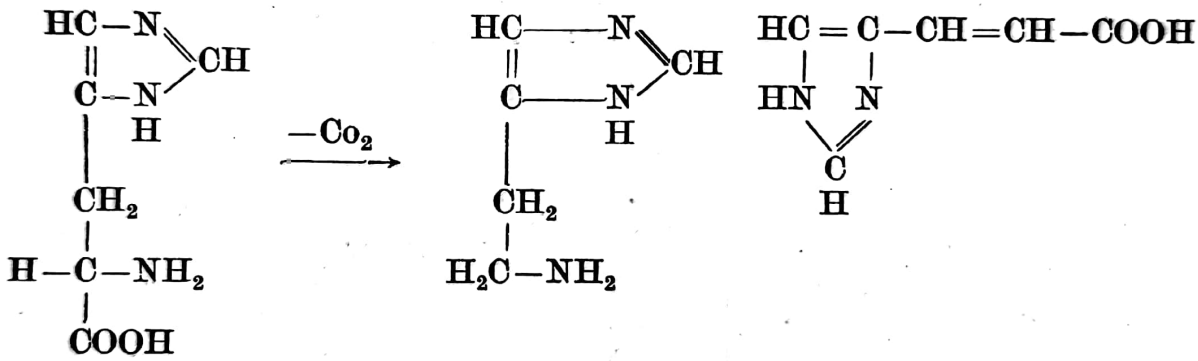
histamină



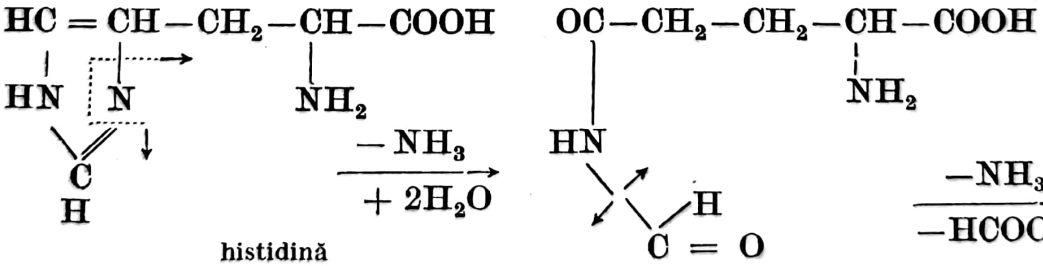
triptamină



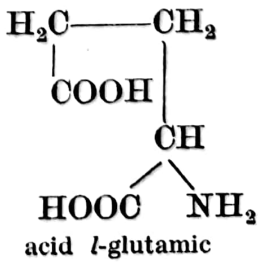
agmatină



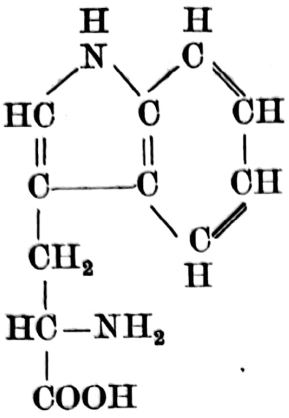
histidină — histamină — acid urocanic (acid iminazilacrilic)



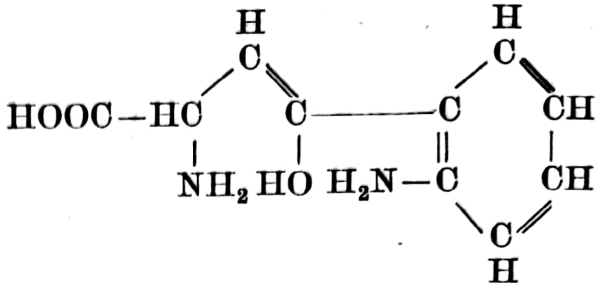
histidină



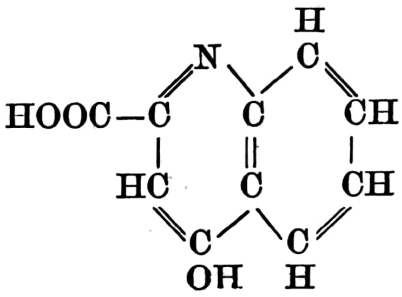
acid *l*-glutamic



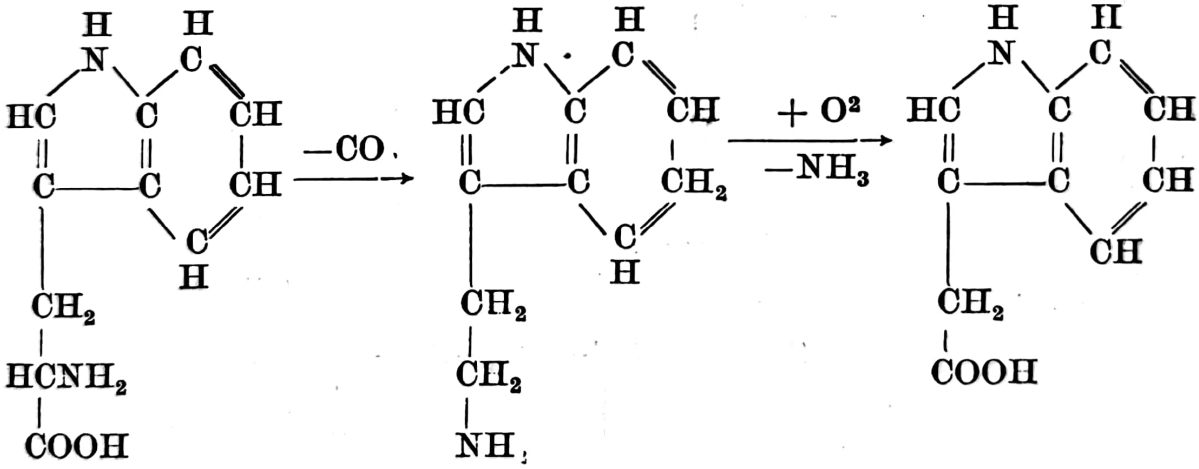
triptofan



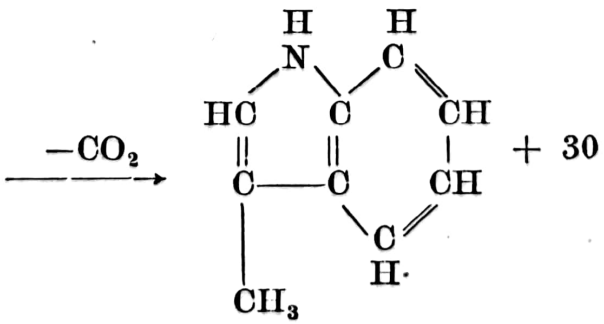
chinurenină



acid chinurenic



triptofan — indoletilamină — indolacidacetic



metilindol (scatol)

CORELAȚIA DINTRE METABOLISMUL PROTEINELOR, GLUCIDELOR ȘI LIPIDELOR

Relația dintre metabolismul proteinelor și al glucidelor

Formarea glucidelor din proteine, respectiv din aminoacizi, a fost demonstrată pe animale florizinice, adică în condițiile unei permeabilități renale crescute pentru glucide, precum și prin metoda organelor izolate și perfuzate. Cu aceste metode s'a putut arăta acțiunea aminoacizilor glucogeni (glicocolul, alanina, cisteina, metionina, norleucina, prolina, serina, valina, arginina, acidul aspartic și glutamic) și a aminoacizilor neglucogeni (izoleucina, leucina, lizina, fenilalanina, tirozina și triptofanul). Capacitatea unei proteine de a forma glucoză apare astfel legată de conținutul ei în aminoacizi glucogeni.

E de observat că aminoacizii glucogeni, ca de exemplu alanina, acidul glutamic, acidul aspartic, sunt capabili de a da cetoacizi: acid piruvic, acid α-cetoglutaric, acid oxaloacetic, care am văzut că apar ca produse intermediare, atât în degradarea și sinteza aminoacizilor, cât și în a glucidelor, stabilind astfel legătura dintre cele două metabolisme. Participarea cetoacizilor în mecanismul transaminării stabilește conexiunea dintre metabolismul aminoacizilor, respectiv al proteinelor, și acela al glucidelor și lipidelor, cetoacizii fiind precursorii imediați ai aminoacizilor. Astfel, acidul piruvic am văzut că este componenta de bază în metabolismul glucidelor, iar acidul α-cetoglutaric din ciclul izocitric (faza aerobă a degradării glucidelor) poate fi acceptor de grupări NH_2 cu formare intermediară de acid iminoglutaric, care prin fixare de 2H trece în acid glutamic. Acidul glutamic, prin transaminare pe cetoacizi, poate să dea naștere la o serie de aminoacizi (pe acidul piruvic poate forma alanina, pe acidul oxaloacetic, acidul aspartic). Prin desaminare poate duce din nou la acid α-cetoglutaric. Acidul oxaloacetic, componentă de plecare în ciclul izocitric (Krebs), poate funcționa ca acceptor al grupării NH_2 cu formare de acid aspartic. Acidul oxaloacetic poate fi format pe seama acidului piruvic, care este o etapă în degradarea glucidelor. Din acidul piruvic, prin condensare cu CO_2 (reacția Wood și Werkmann), am văzut că poate rezulta acidul oxaloacetic:

$$\underset{\text{acid piruvic}}{CH_3-CO-COOH} + CO_2 \qquad COOH-CH_2-CO-\underset{\text{acid oxaloacetic}}{COOH}$$

Reacția este reversibilă, are loc sub acțiunea catalitică a oxaloaceticcarboxilazei și necesită prezența acidului adenozintrifosforic ca donator de energie, reacția de fixare a CO_2 la piruvat fiind puternic endergonică. Radicalul acetic necesar cuplării cu acidul oxaloacetic pentru a forma acidul cisaconitic din ciclul Krebs poate deriva din acidul piruvic prin decarboxilarea acestuia, sau din acidul acetic care rezultă din degradarea acizilor grași. Prin aceasta se stabilește conexiunea metabolismului proteinic și glucidic, și cu acela al lipidelor. In această conexiune, acidul piruvic respectiv, acidul oxaloacetic, ocupă o poziție cheie.

Aceste fapte sunt ilustrate în schemele următoare. Prin transaminare, cetoacizii dicarboxilici sunt continuu introduși sau îndepărtați din ciclul

Scanned with OKEN Scanner

Krebs; or, se ştie că aceşti acizi intervin în lanţul oxidărilor celulare ca transportori de hidrogen.

Transaminarea apare astfel ca fiind importantă şi în reglarea respiraţiei celulare şi deci în metabolismul energetic celular. Aceste procese au, la rândul lor, o influenţă hotărîtoare asupra sintezei proteinelor, întrucât formarea lanţurilor peptidice şi construirea din aceste lanţuri a catenei proteinice este legată de creşterea potenţialului energetic, care necesită un aport de energie liberă.

Sistemul acizilor dicarboxilici glutamic şi aspartic, amidele corespunzătoare glutamina şi asparagina, acizii cetonici corespunzători, acidul piruvic şi alanina, precum şi sistemele enzimatice care catalizează reacţiile de transformare şi de interconversiune între diversele componente ale acestui sistem, reprezintă din acest punct de vedere, datorită mecanismului de transaminare, unul din cele mai importante sisteme ale coordonării metabolice şi energetice.

Există deasemenea o corelaţie anumită între capacitatea organismului de a sintetiza anumiţi aminoacizi şi capacitatea lor glucogenică. Această acţiune glucogenică se găseşte în special la aminoacizii care se pot oxida în cetoacizii din ciclul izocitric, acizii tri- şi acizii dicarboxilici, care am văzut că apar ca produse intermediare în degradarea glucidelor. Sistemul aminoacizilor dicarboxilici stabileşte astfel, prin cetoacizii corespunzători şi mecanismul de transaminare, legătura dintre metabolismul proteinic şi glucidic.

Formarea glucidelor şi a corpilor cetonici din componenta ternară a aminoacizilor pare să fie o funcţie a ficatului.

Relaţia dintre metabolismul proteinelor şi al lipidelor

Transformarea aminoacizilor în grăsimi nu este prea bine cunoscută. Se crede că această transformare se face însă pe calea formării intermediare de glucide ulterior transformate în grăsimi. Am văzut că transformarea acestora în acizi graşi se face în prezenţa fosfaţilor şi a vitaminei B_1.

Compuşii intermediari din metabolismul glucidelor, din care se face şi sinteza acizilor graşi, sunt tot acidul piruvic şi produsul lui de decarboxilare, acetilaldehida, care stabilesc astfel legătura dintre cele două metabolisme.

Este admis de toţi cercetătorii că ciclul acizilor tricarboxilici reprezintă un stadiu comun în oxidarea glucidelor, lipidelor şi aminoacizilor (respectiv proteinelor).

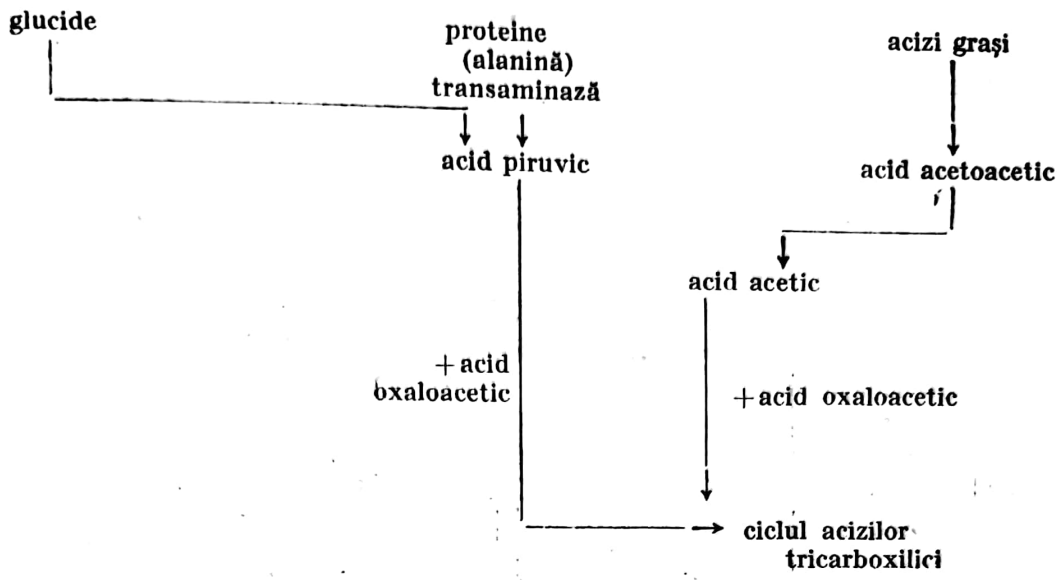
Ciclul lui Krebs *joacă un rol central în interdependenţa dinamică a elementelor chimice a întregului metabolism tisular* [1].

Importanţa primordială a reacţiilor de transaminare în interdependenţa dinamică a elementelor chimice ale metabolismului azotat constă în faptul că ele asigură transformările mutuale reciproce, rapide, a şase din cele mai importante componente ale sistemului acizilor dicarboxilici (acid glutamic, aspartic, alanină, acid cetoglutaric, oxaloacetic şi piruvic), fiecare dintre ele îndeplinind funcţii deosebite, specifice în metabolismul tisular.

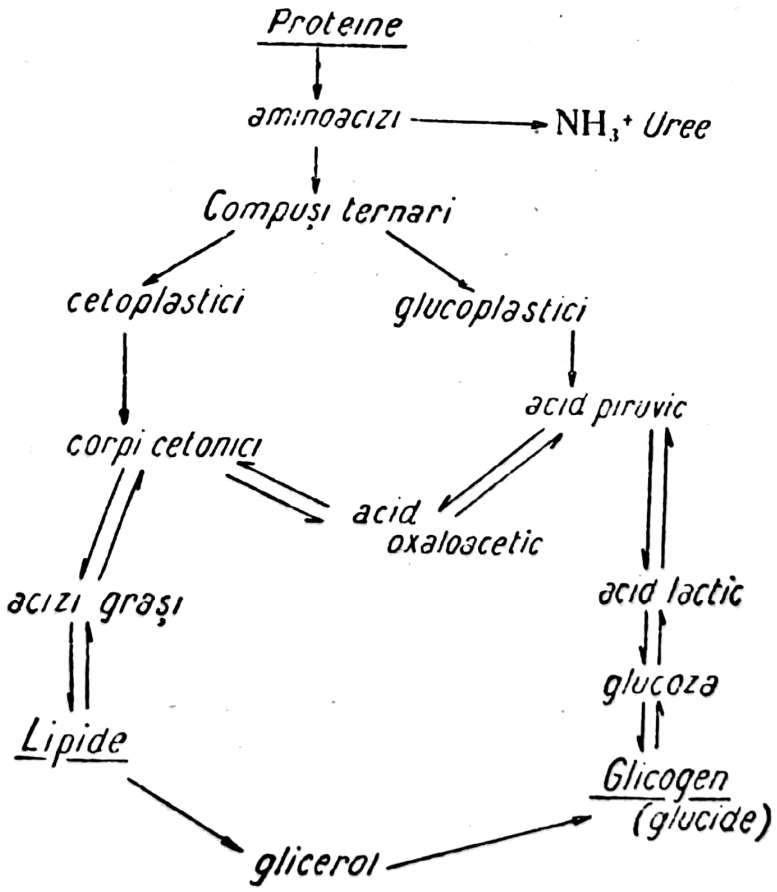
---

[1] *A. L. Braunştain*, Metabolismul biochimic al aminoacizilor.

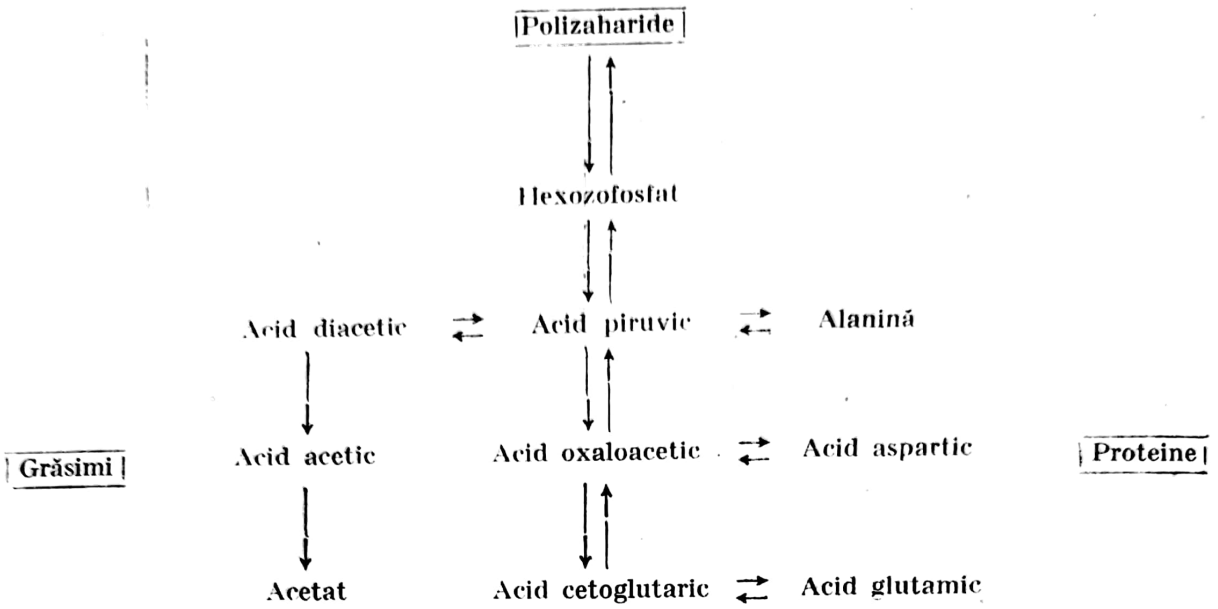
Scanned with OKEN Scanner



Relaţia dintre metabolismul proteinelor, glucidelor şi lipidelor



Relația dintre metabolismul glucidelor, aminoacizilor și lipidelor



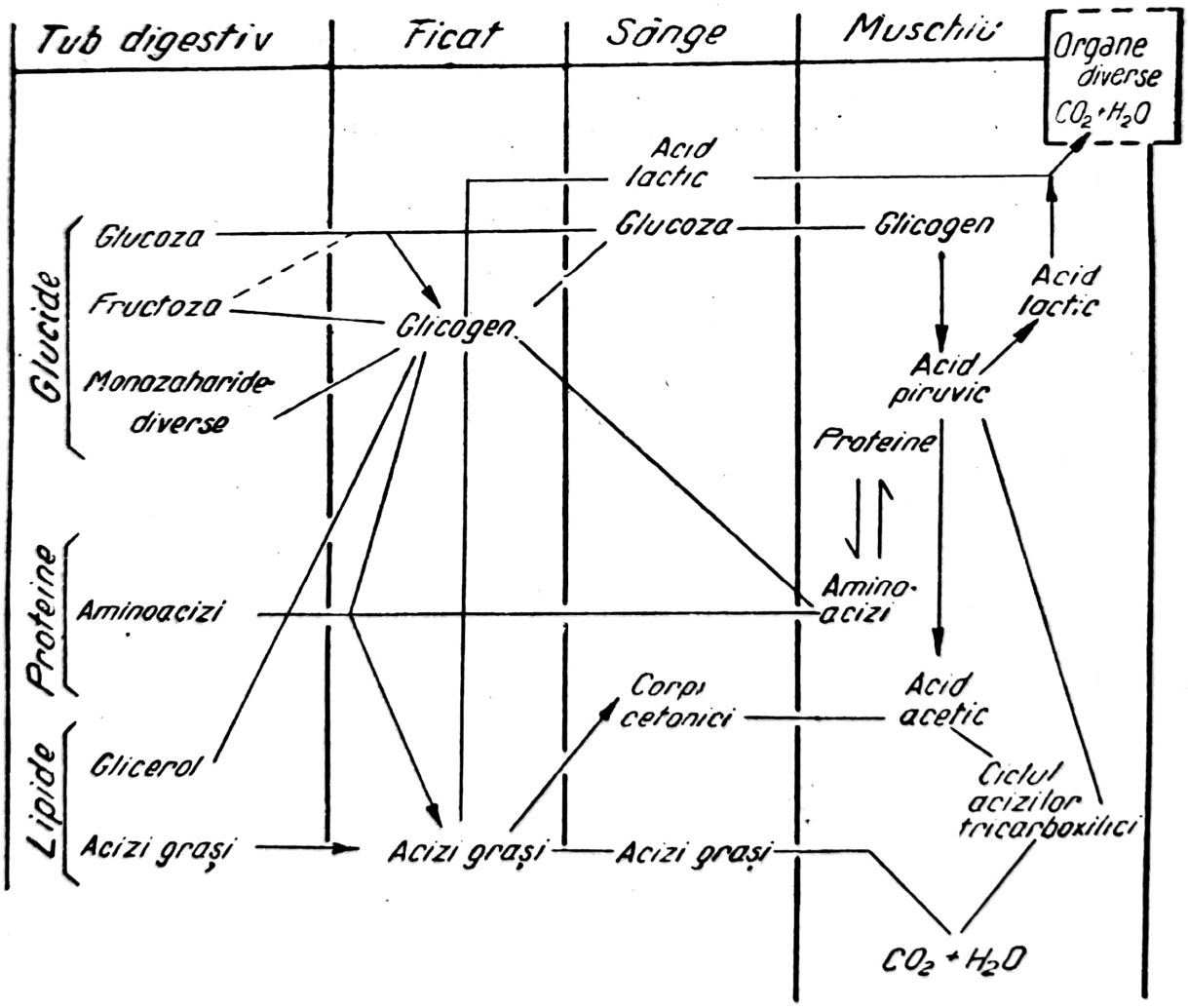


Fig. 111. Schema generală a metabolismului glucidelor (interrelația cu metabolismul proteinelor și al lipidelor).

METABOLISMUL HEMOGLOBINEI

Hemoglobina, pigmentul sanguin al tuturor vertebratelor, este o cromoproteină formată din aproximativ 96% globină şi 4—5% protohem. Protohemul este identic pentru toate hemoglobinele tuturor speciilor. Globina este specie- şi organospecifică. Hemoglobina corespunde aproximativ la 14—16 g% cc sânge total. Ea constitue massa principală a globulului roşu. In mod normal, se găseşte toată în eritrocite, de unde poate fi însă eliberată sub acţiunea diverşilor factori hemolitici. Rolul hemoglobinei este acela de transportor de oxigen în organism. Oxigenul se găseşte în sânge parte în stare solubilă, parte legat. In stare solubilă este fixat în plămân, conform legilor de difuziune şi absorbţie a gazelor, de unde apoi se dizolvă în plasmă. Cantitatea de oxigen fixată în acest fel este însă total insuficientă. Sângele, respectiv hemoglobina, are rolul să corecteze acest lucru prin capacitatea lui de a fixa reversibil oxigenul. Hemoglobina participă la menţinerea echilibrului acido-bazic. In ceeace priveşte structura chimică a hemoglobinei, ea a fost expusă în detaliu la capitolul biochimiei acestui compus. In acest capitol vom expune deci numai metabolismul hemoglobinei.

Studiul metabolismului hemoglobinei cuprinde pe de o parte *sinteza*, respectiv regenerarea ei în organism, şi pe de altă parte degradarea ei în organism, *catabolismul* hemoglobinei.

SINTEZA HEMOGLOBINEI

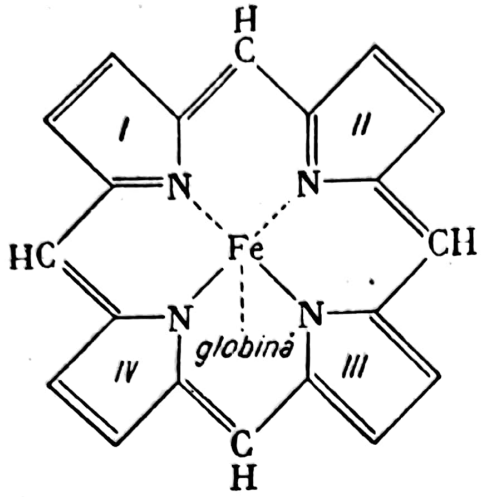
Organismul are capacitatea de a sintetiza hemoglobina; în cazurile de anemie experimentală s'a dovedit că există o regenerare rapidă, atât a globulului roşu, cât şi a hemoglobinei. De altfel, chiar în condiţii normale, are loc o continuă regenerare a hemoglobinei care să înlocuiască globulul roşu ce se distruge continuu în organism. Se admite că durata vieţii eritrocitului este de 140—150 de zile şi că zilnic se distrug 3—6 g hemoglobină. Aceasta înseamnă că în 140—150 de zile se distrug 700 g hemoglobină, deci toată hemoglobina se reînnoieşte în mod normal în 194 de zile. (Acest calcul s'a făcut pe baza faptului că la om există o eliminare zilnică de 150 mg urobilină, ceeace corespunde la 3,6 g hemoglobină degradată).

S'a studiat regenerarea hemoglobinei la animalele anemiate experimental. Se administrează acestor animale diverse componente, urmărind concomitent regenerarea hemoglobinei.

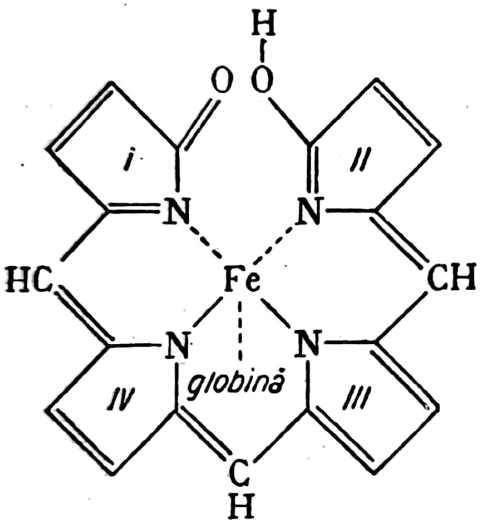
Hemoglobina este sintetizată în organism din componente ale alimentaţiei — fier, surse de nucleu porfirinic, şi aminoacizi care pot fi precursori ai componentei ei proteinice, globina. S'a constatat că fierul sub diverse forme, compuşi minerali sau organici, accelerează regenerarea hemoglobinei, lucru explicabil, acesta fiind o componentă a moleculei de Hb. Necesitatea zilnică de fier la om este de 0,6 mg. S'a constatat însă că fierul din alimentaţie nu poate fi transformat în hemoglobină decât în prezenţa urmelor de cupru care exercită o acţiune catalitică specifică de stimulare, chiar în cantităţi de 0,1 mg zilnic. Urme de mangan deasemenea ar avea acţiune de stimulare, la fel cobaltul. O turburare în metabolismul fierului duce la o depozitare excesivă de fier şi a unui pigment numit hemosiderină. In boala cu numele de hemocromatoză are loc o depozitare a pigmentului în ficat, în celulele Kupfer şi celulele parenchimatoase.

Scanned with OKEN Scanner

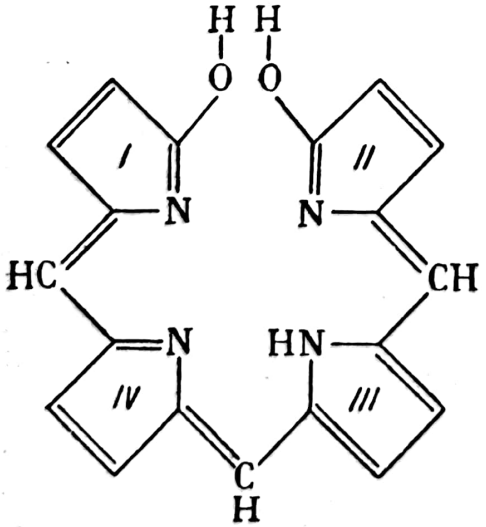
In hemosideroză are loc o depozitare a hemosiderinei în țesuturi, în urma unei hemolize intense a globulului roșu — ca în malarie, icter hemolitic.



Hemoglobina



Pseudohemoglobina



Biliverdina

In ceeace privește sinteza inelului porfirinic, cunoștințele nu sunt prea avansate. Organismul poate sintetiza grupări pirolice; experiențele cu izotopii ar arăta o participare a glicocolului și a acidului acetic la această sinteză. Aminoacizi cu acțiune hematogenă și cu rol în formarea globinei ar fi histidina, triptofanul, prolina, metionina. Rol analog au vitaminele din grupul B (acidul folic ar juca un rol important în hematopoieză; este utilizat cu succes în anumite anemii).

Mecanismul intim al sintezei hemoglobinei este încă necunoscut. La animalul adult, eritrocitele se formează în măduva oaselor; la embrion, ficatul are un rol important în producerea globulelor roșii; totuși, și la adult, ficatul are un rol important în sinteza hemoglobinei.

Dacă mecanismul de sinteză al hemoglobinei are încă multe necunoscute, degradarea hemoglobinei în organism este mult mai bine cunoscută și o vom expune în cele ce urmează.

CATABOLISMUL HEMOGLOBINEI

In organism, produsul final normal de degradare a hemoglobinei este bilirubina excretată în căile biliare și eliminată prin fecale și urină sub formă de stercobilină și urobilină. In afară de această cale de degradare normală există forme de degradare patologică care duc la formare de porfirine în cantități mari.

Degradarea hemoglobinei în pigmenții biliari

Degradarea hemoglobinei în pigmenții biliari s'ar face prin următoarele etape:

1. *Desfacerea oxidativă a ciclului porfirinic* între ciclul pirolic I și II cu producere de CO_2 la nivelul grupării α-metenice și formarea unui compus

cu 4 cicluri pirolice, dar desfăcute. In acest proces, fierul mai există în moleculă şi se mai păstrează legătura cu globina. Se formează *coleglobina*, un pigment verde, care mai conţine deci fier şi globină, dar care are un ciclu deschis (verdohemoglobina);

2. Deschiderea ciclului labilizează legătura cu fierul şi globina care se desface cu uşurinţă şi rezultă o componentă fără fier, *bilirubinoglobina*, şi apoi şi fără globină, cu catenă deschisă: *biliverdina*, care e redusă la *bilirubină* (fig. 112).

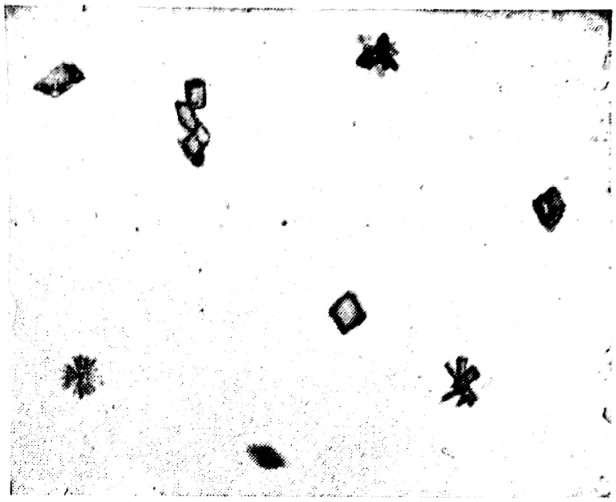


Fig. 112. Bilirubina

hemoglobină
↓
verdohemoglobină
↓ −Fe
bilirubinoglobină
↓ −globină
biliverdină
↓ reducere
bilirubină
↓ reducere
urobilinogen
↓ oxidare
urobilină

3. Stadiile ulterioare de transformare a pigmenţilor biliari rezultă sub acţiunea bacteriilor intestinale. In lumenul intestinal, bilirubina e redusă sub acţiunea acestora în *mezobilirubinogen*. Acest compus e redus mai departe în *stercobilinogen*, din care o parte trece în fecale unde, prin oxidare, e transformat în *stercobilină*, pigmentul fecalelor normale (respectiv în *urobilinogen*, care prin oxidare formează *urobilina* din urină). Această acţiune are loc în ficat, rinichi, creier sub acţiunea dehidrogenazelor. Fierul este depozitat în ficat şi splină; globina este din nou folosită pentru sinteza hemoglobinei. Locul de formare a bilirubinei este sistemul reticulo-endotelial din diversele organe (ficat, splină, măduva oaselor) şi ar fi un proces intracelular. S'a calculat că 1 g hemoglobină formează 40 mg bilirubină.

Ciclul entero-hepatic al pigmenţilor biliari

O fracţiune din stercobilinogen este reabsorbită din tractul intestinal în circulaţia portă şi trecută în ficat, oxidată în bilirubină şi reexcretată în bilă. Acest ciclu de transformări constitue aşa numitul ciclu entero-hepatic al pigmenţilor biliari. O foarte mică parte trece în curentul sanguin şi e excretată apoi prin rinichi, în urină. In urină, aceşti doi pigmenţi sunt cunoscuţi sub numele de urobilinogen şi urobilină.

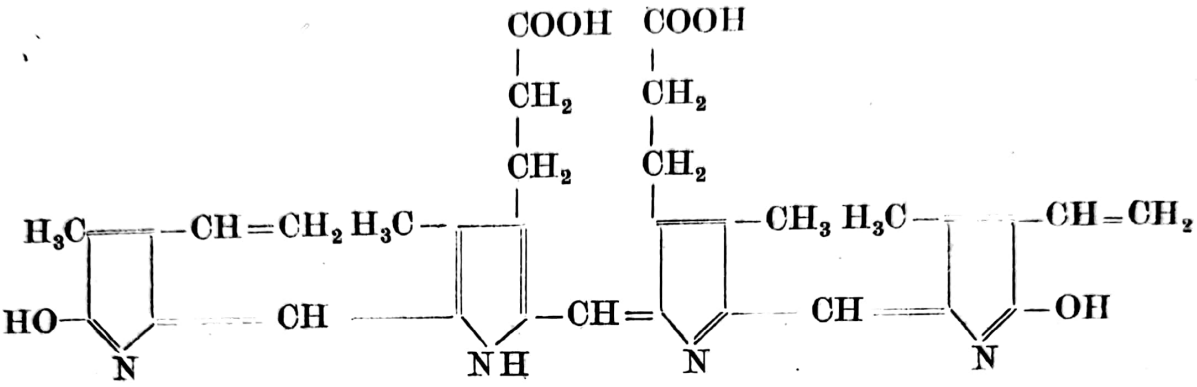
O disfuncţie hepatică (hepatită infecţioasă sau ciroze) face ficatul incapabil de a excreta întreaga cantitate de bilirubină, de unde icter cu trecerea bilirubinei în urină. Incapacitatea de a fixa stercobilinogenul reabsorbit prin peretele intestinal determină apariţia şi a acestuia în urină (urobilinogen). Dacă, dimpotrivă, ficatul este normal, dar există o distrugere exagerată de globule roşii, deci de hemoglobină (anemie megaloblastică, biermeriană icter hemolitic, intoxicaţii), ficatul nu poate excreta întreaga cantitate şi bilirubina din sânge creşte deasemenea. Pe de altă parte o mare cantitate de bilirubină excretată produce în intestin cantităţi mari de urobilinogen şi de stercobilinogen, care sunt parţial reabsorbiţi

Scanned with OKEN Scanner

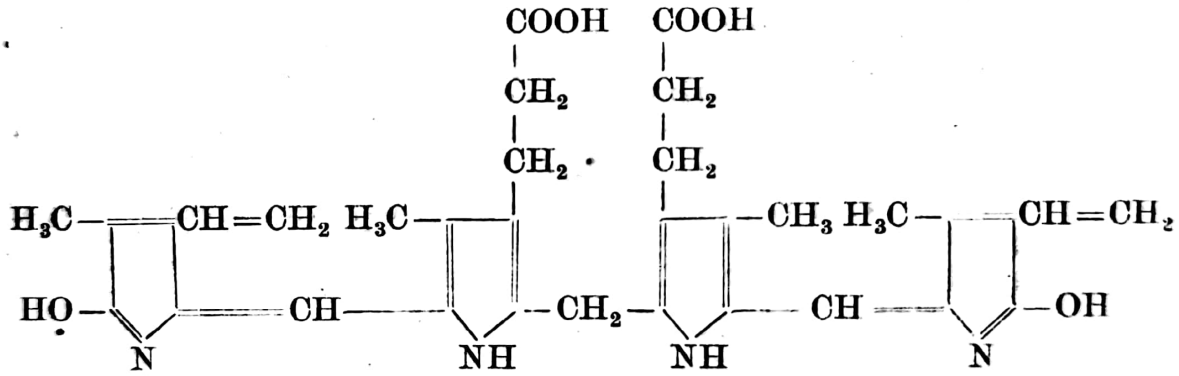
de peretele intestinal şi parţial fixaţi la nivelul ficatului, de unde trec din nou în urină.

Se pot reda schematic degradarea hemoglobinei şi ciclul enterohepatic în felul următor :

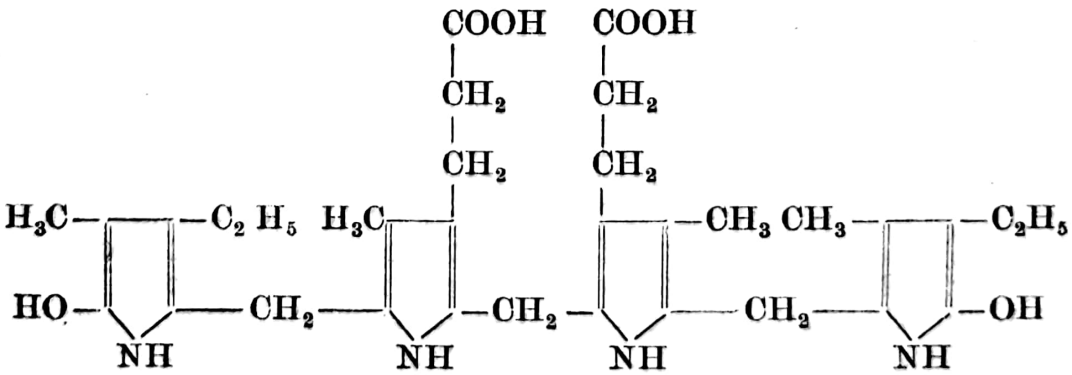
Pigmenţii biliari



biliverdină

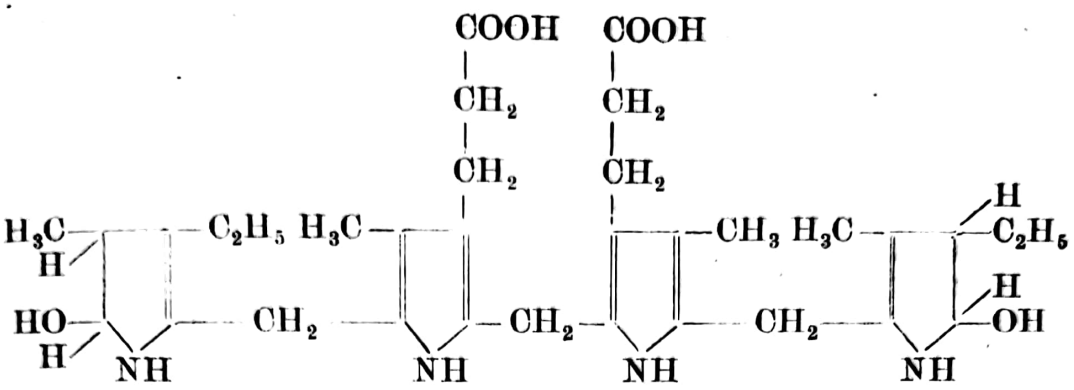


bilirubină

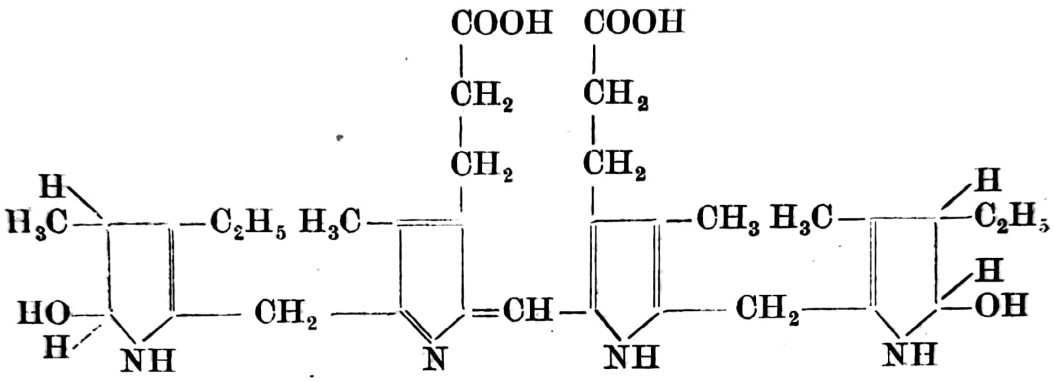


mezobilirubinogen

Scanned with OKEN Scanner

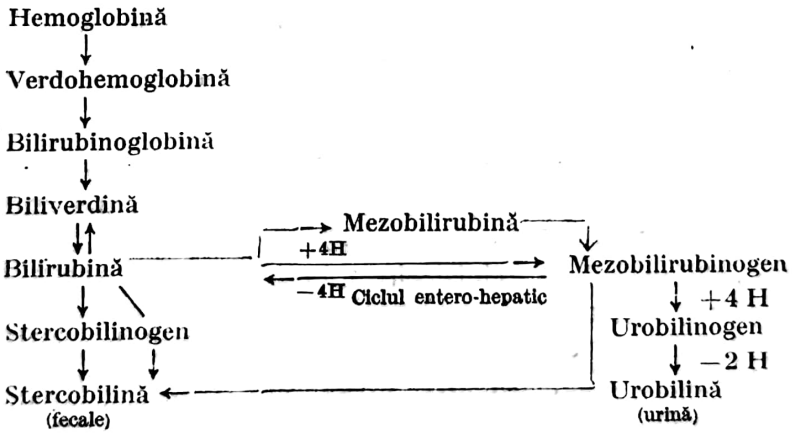


stercobilinogen

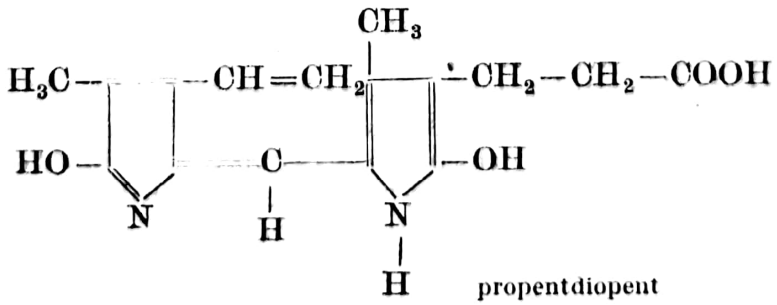


stercobilină (urobilină)

Ciclul entero-hepatic al pigmenților biliari



Hemoglobina poate fi degradată într'un compus care mai conține numai două cicluri pirolice, *propentdiopentul*, având probabil formula :

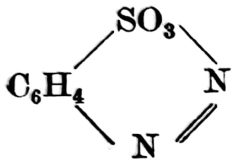


propentdiopent

Locul de formare al propentdiopentului ar fi rinichiul şi în acest proces ar interveni apa oxigenată. In condiţii patologice, acest compus apare în urină, constituind propentdiopenturia, care se pune în evidenţă prin transformarea lui într'un pigment roşu, pentdiopentul (în prezenţa unei soluţii de KOH şi hidrosulfit de sodiu), cu o absorbţie maximă la 525 mμ. In mod normal, catalaza descompune H_2O_2 care rezultă din arderile celulare şi care ar putea realiza această transformare a hemoglobinei în propentdiopent. Urina ictericilor dă aproape totdeauna reacţia pentdiopentului.

Forma sub care se găseşte bilirubina în bilă, sânge şi urină

P. Ehrlich a arătat că bilirubina formează cu acidul diazobenzensulfonic :



un compus cuplat care dă o coloraţie roşie ce trece ulterior în violet-albastru. Reacţia se petrece în mediu clorhîdric. Această reacţie constitue aşa numita diazoreacţie a pigmenţilor biliari. Hymans van den Bergh a transformat această reacţie într'o metodă cantitativă de dozare a pigmenţilor biliari în sânge.

Cu ajutorul reactivului lui Ehrlich se observă însă un lucru foarte interesant, şi anume, în serul sanguin diazoreacţia este slab pozitivă şi apare lent atunci când se face pe serul nativ. Dacă reacţia se face pe ser sanguin după îndepărtarea proteinelor cu alcool, are loc o reacţie mai netă şi mai rapidă. Aceste două reacţii constitue diazoreacţia directă şi, respectiv, diazoreacţia indirectă şi indică existenţa unei bilirubine libere şi a unei bilirubine legate de proteinele din ser. S'a constatat faptul important că intensitatea şi viteza reacţiei directe Hymans van den Bergh variază în diverse procese icterigene aşa fel că se poate face, cu ajutorul acestei metode, diagnosticul diferenţial între icterul mecanic şi cel hemolitic.

Se ştie că retenţia pigmenţilor biliari în sânge poate fi datorită unor cauze diverse. Normal, în ser există o medie de 0,6 mg% (0,2—1 mg%) pigmenţi biliari. In ictere, această valoare este crescută.

1. *Obstrucţia căilor biliare* (icterele mecanice). In acest caz, proba directă este pozitivă într'un interval mai scurt decât cel normal şi, bineînţeles, mai intensă (în mod normal, proba directă e slab pozitivă).

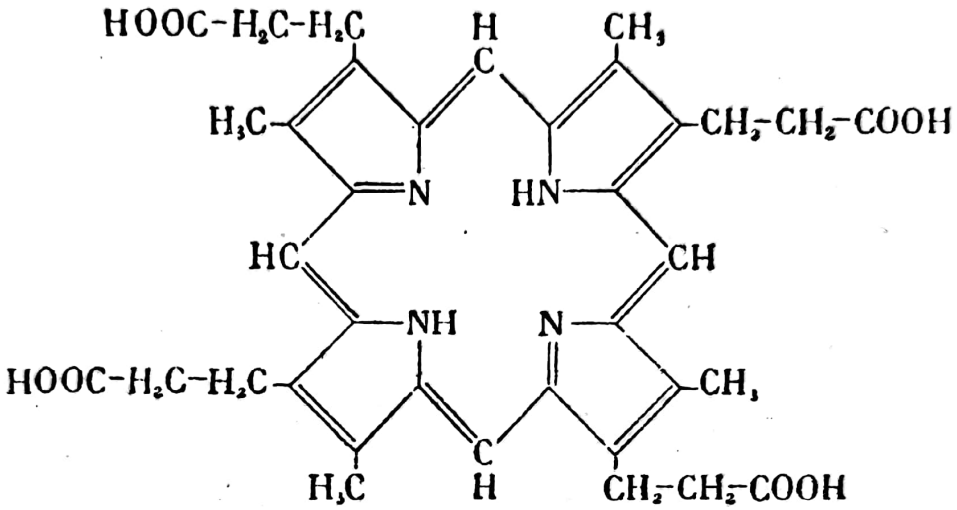
2. In *icterele hemolitice, anemie megaloblastică, biermeriană*, proba directă este slab pozitivă, proba indirectă intens pozitivă. In acest caz are loc o creştere a bilirubinei datorită unei eliberări masive de hemoglobină cu transformare în bilirubină în cantităţi mari, care depăşesc posibilităţile de eliminare, dând loc unei acumulări în sânge. Când acumularea în sânge depăşeşte anumite valori (2 mg%), pigmentul trece în ţesuturi; bilirubina care dă diazoreacţia directă este eliminată în urină. In unele afecţiuni ale ficatului apar în urină elementele care în mod normal trec în bilă. In cazul unei obstrucţii a căilor biliare, ele se acumulează în sânge, de unde apoi se elimină prin urină; aşa sunt: acizii biliari, pigmenţii biliari, urobilinogenul, urobilina şi uneori colesterolul. Urobilinogenul şi urobilina se găsesc în acest caz în cantităţi mai mari decât cele normale, şi mai apar acizi şi pigmenţi biliari care, în mod normal, sunt absenţi.

Scanned with OKEN Scanner

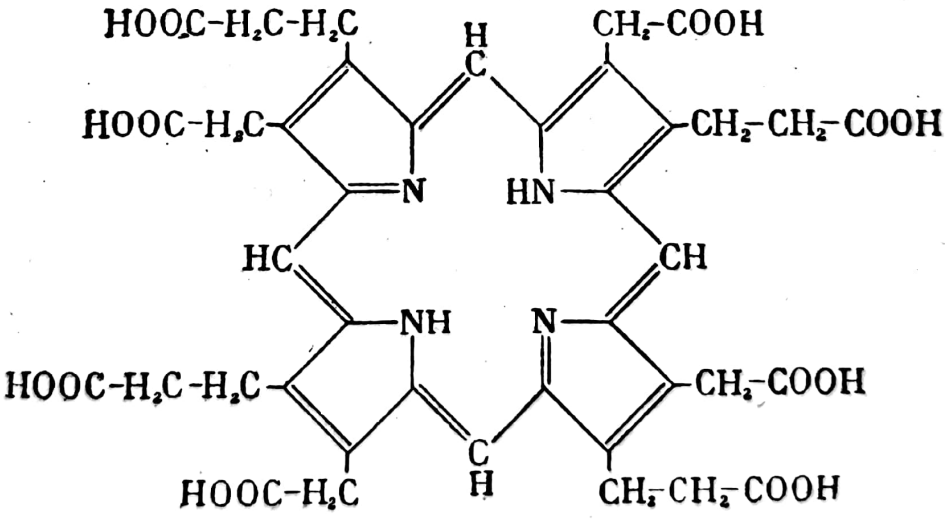
Porfiriile

Porfirinele sunt derivaţi de porfină. Am văzut care este relaţia între hemoglobină şi porfină. Se disting două serii de porfirine:

1. porfirine cu 4 grupuri metilice în poziţiile 1, 3, 5 şi 8 şi
2. porfirine cu 4 grupuri metilice în poziţie 1, 3, 5, 7. Nu conţin fier în moleculă, nici proteină. Unele porfirine sunt produse intermediare în degradarea hemoglobinei şi se elimină în bilă. In mod normal există o eliminare în cantităţi mici de porfirină în urină:



coproporfirina I



uroporfirina I

Uroporfirina I şi *coproporfirina* I. Prima derivă din atroporfirina I (1, 3, 5, 7 — tetrametil, 1, 2, 4, 6, 8 — tetrametilporfirin), cea de a doua din atroporfirina III. In alterări ale ficatului (ciroză, icter cataral, icter salvarsanic) creşte conţinutul în porfirină al urinei. Ficatul bolnav nu poate reţine porfirina şi aceasta trece în sânge şi de aci în urină.

Porfiriile sunt boli caracterizate prin apariţia în urină a unor cantităţi mari de porfirine fiziologice sau anormale.

Scanned with OKEN Scanner

In anumite intoxicaţii cu plumb, sulfonal, creşte mult porfirina din urină. Există o porfirie congenitală, în care se constată o creştere mare a porfirinelor din urină; în acest caz se găsesc toate 4 tipurile de porfirină. Urina acestor bolnavi este roşietică (datorită în special uroporfirinei I). Are loc şi o depozitare a pigmentului în dinţi, piele, oase. In porfiria acută apar mari cantităţi de porfirină tip III şi cantităţi mici de coproporfirină tip I. Sensibilitatea la lumină nu este atât de mare ca în cazul porfiriei cronice sau patologice. O veveriţă (*Sciorusa niger*) are oasele roşii, datorită prezenţei uroporfirinei I; este o porfirie fiziologică.

Porfiricii, adică oamenii care suferă de porfirie (cronică sau prin ana — sau catabolism patologic al hemoglobinei) sunt extrem de sensibili la acţiunea luminii. S'a putut arăta la aceşti bolnavi, la care ţesuturile şi în special pielea sunt impregnate cu porfirină, că expunerea la soare duce la umflături şi chiar la leziuni grave. Sensibilitatea la lumină a pelagroşilor poate fi explicată prin cantitatea mare de coproporfirină care se formează în această boală.

Porfirinele au deci o acţiune fotodinamică, dovedită printr'o serie de experienţe. Dacă globulele roşii, infuzoriile sau enzimele sunt puse în soluţii cu porfirine, atâta timp cât sunt menţinute la întuneric nu se întâmplă nimic; expuse la lumina soarelui, globulele roşii sunt hemolizate, infuzoriile mor, enzimele îşi pierd activitatea. Experienţe făcute pe şoareci albi cărora li s'au injectat porfirine arată că animalul se comportă perfect normal cât timp este ferit de lumina soarelui. Expus ei, pielea se înroşeşte, animalul are fobia luminii şi scurt timp după aceea moare în convulsii. Şoarecii negri nu prezintă aceste fenomene. Acţiunea fotodinamică a porfirinelor se poate compara cu aceea a clorofilei. Se decelează porfirinele în urină prin fluorescenţa lor în lumină ultravioletă.

METABOLISMUL NUCLEOPROTEIDELOR

DEGRADAREA NUCLEOPROTEIDELOR

Nucleoproteidele sunt heteroproteide în care componenta prostetică este constituită din acizi nucleici. Acizii nucleici probabil că stabilesc legătura cu componentele bazice din molecula proteinelor (care sunt de tipul histonelor şi protaminelor).

Digestia nucleoproteidelor începe în stomac, unde, sub acţiunea sucului gastric, are loc o scindare în cele două componente, proteina şi *nucleina*. Sucurile pancreatic şi intestinal (tripsina) desfac nucleina în *acizi nucleici* şi proteină. Sucul intestinal transformă acizii nucleici, care sunt oligonucleotide, în *mononucleotide*, sub acţiunea catalitică a enzimelor speciale, polinucleotidazele, care sunt enzime de depolimerizare. O parte din mononucleotide sunt absorbite prin peretele intestinal ca atare, iar o altă parte sunt desfăcute sub acţiunea nucleotidazelor din sucul şi mucoasa intestinală în *nucleozide* şi *acid fosforic*, sub acţiunea unei fosfataze. Nucleozidele, care sunt glicozide ale bazelor azotate, sunt absorbite ca atare în peretele intestinal, iar în mucoasa intestinală, sub acţiunea unei enzime, o nucleozidază, sunt scindate în *baze purinice* şi *pentoze*. Totuşi, absorbţia se face probabil sub formă de nucleozide, deoarece sunt uşor solubile, deci absorbabile, pe când bazele purinice sunt greu solubile, deci mai greu absorbabile. Mononucleotidele şi nucleozidele sunt duse pe cale sanguină

Scanned with OKEN Scanner

la ţesuturi, unde are loc o degradare totală a lor, sau sunt utilizate pentru resinteza acizilor nucleici.

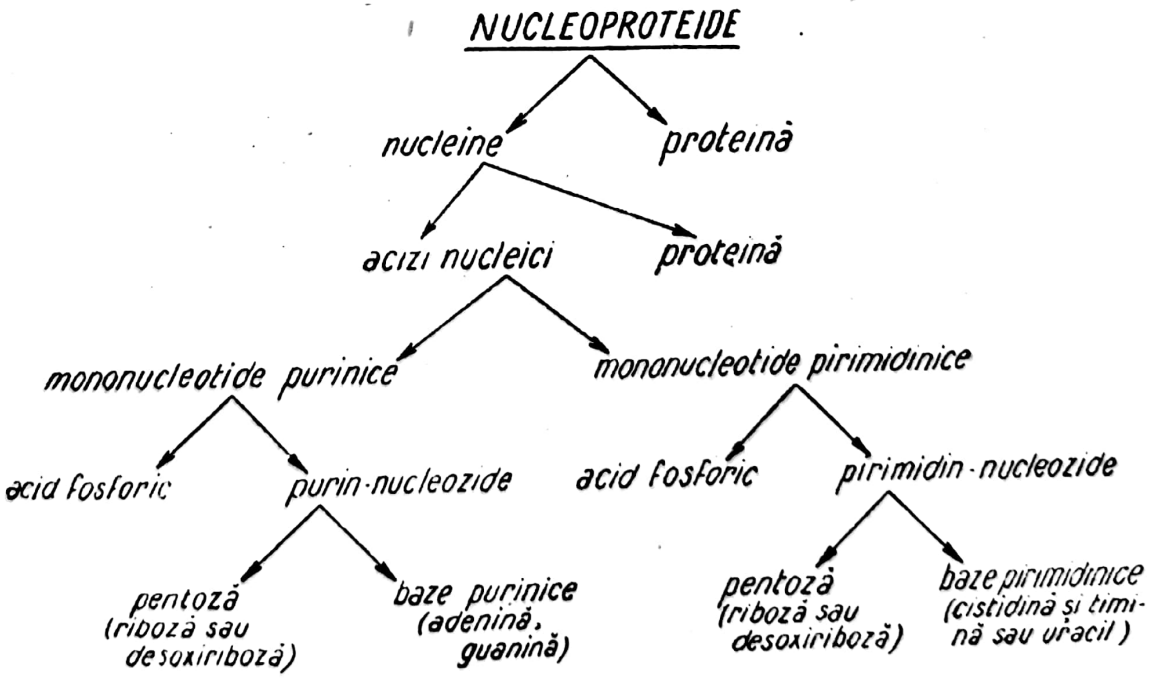
In ţesuturi, nucleotidele şi nucleozidele pot fi scindate până la ultimele lor produse de degradare, dar prin mecanisme diferite. Nucleotidele, sub acţiunea unei nucleotidaze, sunt desfăcute în nucleozid şi acid fosforic. Nucleozidele, sub acţiunea unei nucleozidaze, sunt desfăcute în baza azotată şi pentoză; metabolismul final al acizilor nucleici se reduce deci la metabolismul ultimelor lor componente de scindare care sunt: pentoza, bazele purinice şi acidul fosforic.

Metabolismul acidului fosforic este simplu; se elimină prin urină.

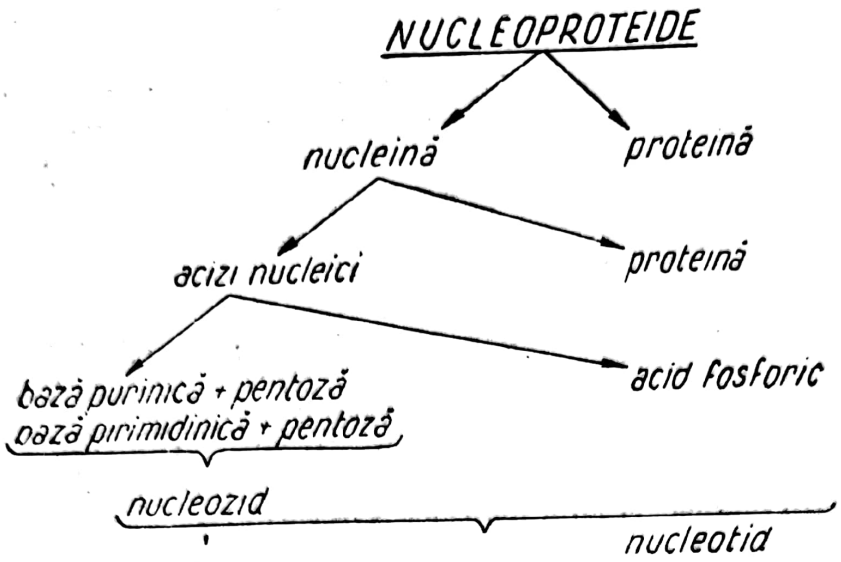
Metabolismul pentozei e obscur, e probabil o degradare la CO_2 şi H_2O.

Metabolismul bazelor azotate. Purinele şi pirimidinele au o deosebită importanţă, fiind componente ale unor vitamine şi enzime cu rol fiziologic fundamental (niacina, coenzima I şi II, flavienzimele, etc.). Combinate cu acidul fosforic şi cu o pentoză, constitue componenţi care intervin în procesele metabolice şi energetice, ca de exemplu acidul adenilic, acidul adenozintrifosforic, care am văzut că au un rol central în metabolismul glucidic. Acidul adenilic nu se găseşte în general sub forma liberă, deoarece este instabil, pierde cu uşurinţă amoniacul şi se transformă în acid inozinic.

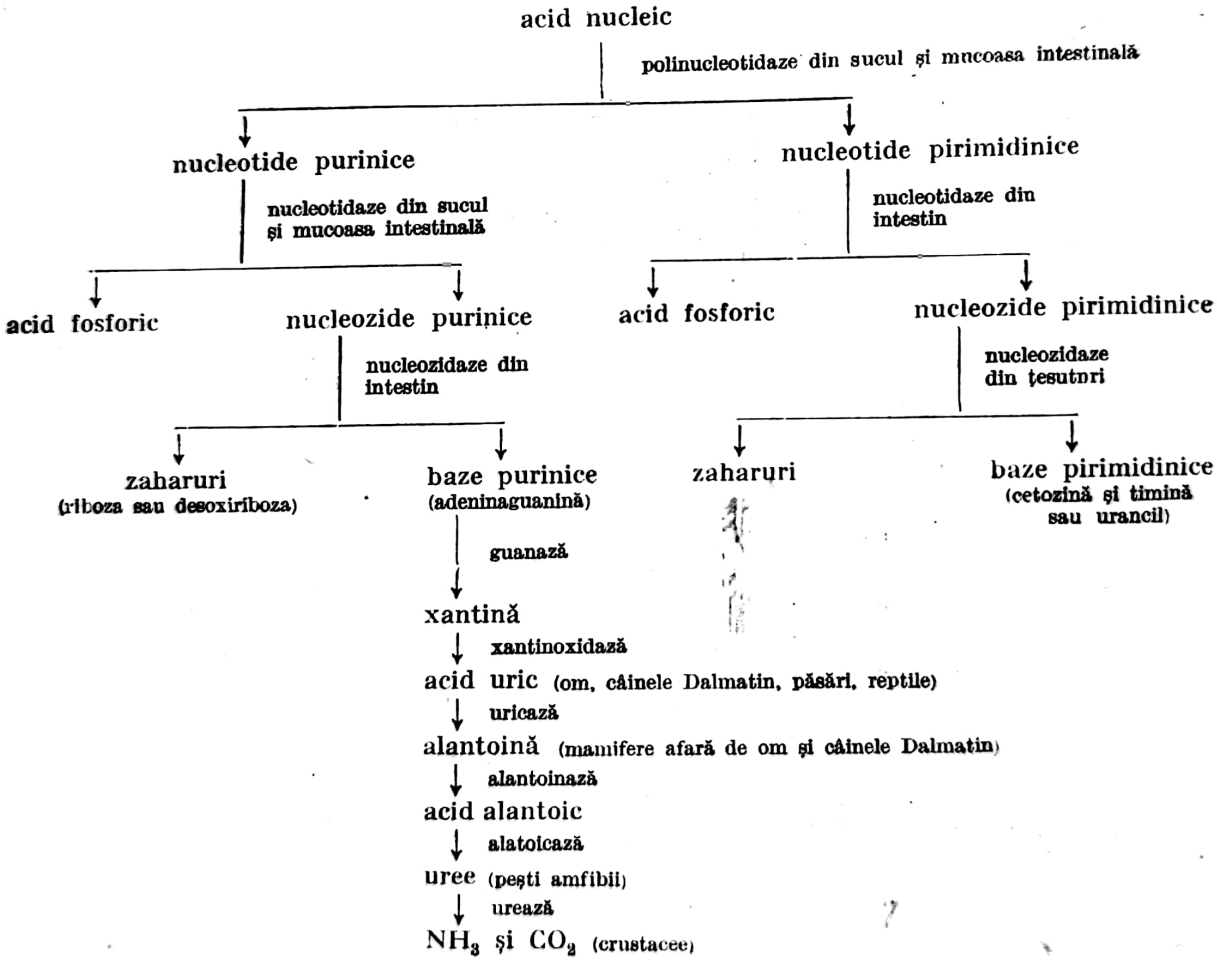
nucleoproteide → proteine
↓
acid nucleic (polinucleotide)
↓
mononucleotide (nucleotide)
↓ ↓
PO_4H_3 → nucleozide
↓
pentoze + bază azotată



Scanned with OKEN Scanner



Degradarea acizilor nucleici



Metabolismul bazelor purinice și pirimidinice

Nu se cunoaște cu precizie mecanismul de degradare a *bazei pirimidinice*. Se știe, în orice caz, că are loc o desfacere a ciclului pirimidinic cu eliminare de azot sub formă de uree. Mecanismul de degradare a

bazelor purinice este mai bine cunoscut. Bazele purinice sunt degradate în organismul uman şi la maimuţele antropoide până la acid uric. La celelalte animale, produsul ultim de degradare este alantoina.

Bazele purinice care intră în structura acizilor nucleici sunt *guanina* (fig. 113) şi *adenina*; acestea, sub acţiunea unor enzime specifice, desaminaze şi oxidaze, sunt transformate în acid uric. Prin desaminare hidrolitică se ajunge la hidroxipurină şi anume, din adenină la *hipoxantină*, iar din guanină la *xantină* (fig. 114). Hipoxantina este hidoxi-6-purină. Xantina este dihidroxi-2,5-purină. Enzima care face desaminarea adeninei se numeşte adenază, aceea care face desaminarea guaninei se numeşte guanaza. Din xantină, sub acţiunea unei enzime specifice, xantinoxidaza, rezultă *acidul uric* (2, 6, 8-trioxipurina), care se excretă în urină sub formă de săruri de sodiu sau potasiu.

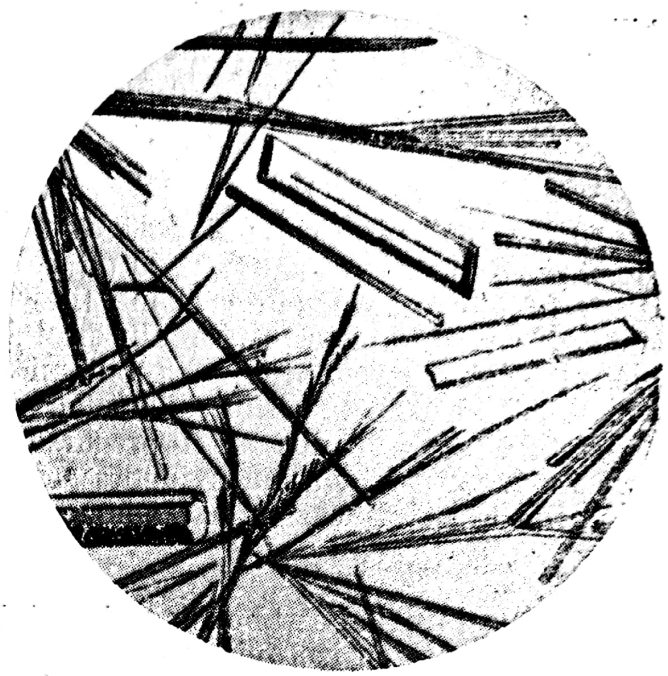


Fig. 113. Clorura de guanină

Acidul uric se găseşte în mare cantitate în ficat, rinichi, lapte. Se elimină ca atare prin urină la om şi maimuţe antropoide, iar la celalte animale este oxidat mai departe, cu deschiderea ciclului iminazolic din moleculă şi formare de *alantoină*, sub acţiunea unei enzime specifice, uricaza. Procesul de transformare a acidului uric în alantoină poartă numele de uricoliză (are loc în special la câine). La alte animale, alantoina e transformată în *uree*. Păsările şi reptilele nu elimină proteinele sub formă de uree, ci sub formă de acid uric; există deci posibilitatea unei neoformări de acid uric şi din alte substanţe decât purinele. In cazul unui metabolism defectuos al purinelor se constată modificări ale eliminării şi fixării de acid uric în organism.

Fig. 114. Xantina

Una din caracteristicile acidului uric este slaba solu-

bilitate în apă, de exemplu la 18° se disolvă o parte acid uric la 39 500 părți apă. Omul elimină zilnic 0,4—0,7 g acid uric, fie sub formă de urați alcalini, fie sub formă de acid uric liber, fie sub formă combinată cu glicocolul. Prezența fosfaților în urină mărește solubilitatea lui.

Sinteza purinelor și pirimidinelor în organism

In organism are loc o sinteză a purinelor și pirimidinelor. Purinele și pirimidinele se pot sintetiza în organism din produsele de metabolism. Acest fapt a fost dovedit la somn (pește) care, în epoca de depunere a ouălor, transformă o parte din proteinele lui musculare în nucleine ale organelor de reproducere. Șobolanii menținuți în complectă inaniție proteinică excretă în urină alantoină și purine în exces.

Histidina și arginina ar fi precursorii importanți a purinelor, lucru care nu a putut fi pus în evidență în experiențele cu izotopi. Se crede că purinele se formează din amoniac.

Metabolismul acidului uric

Compusul final al catabolismului purinic și pirimidinic la om este acidul uric. Experiențe cu izotopi au arătat că acidul uric poate fi format, atât din bazele purinice, cât și din cele pirimidinice.

La om, acidul uric are o origină exogenă (adus prin alimentație) și o origină endogenă (din bazele purinice). La păsări, acidul uric poate fi sintetizat din amoniac.

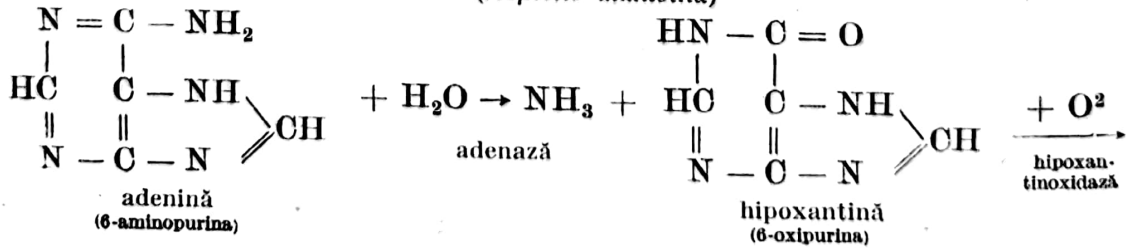
Acidul uric este excretat în urină sub formă de acid uric liber, dar în general sub formă de urați (de sodiu, potasiu, amoniu). Eliminarea medie zilnică de acid uric variază între 0,3—0,4 g.

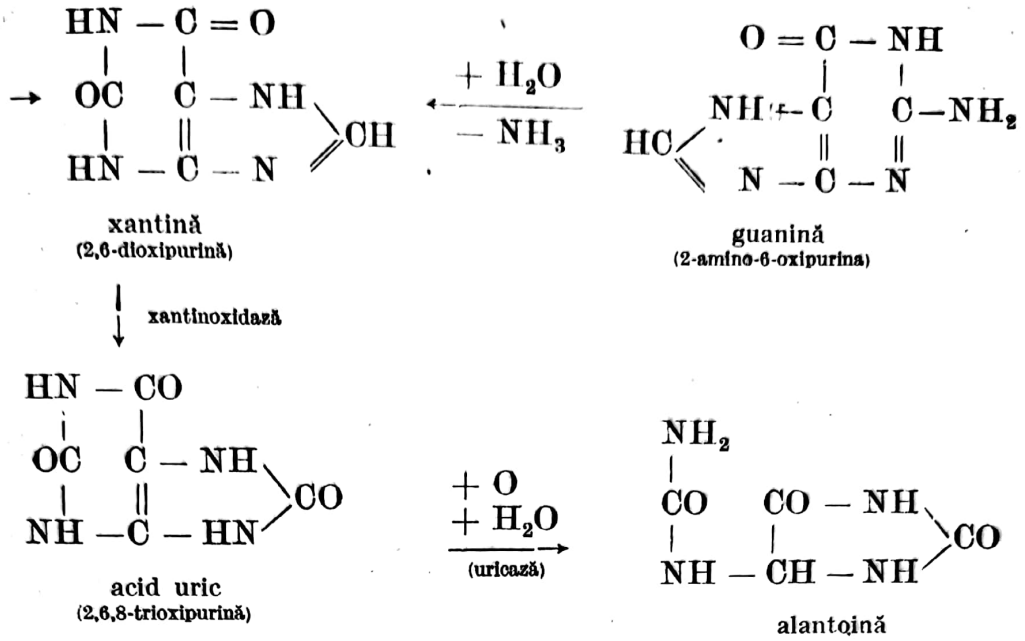
In sânge, acidul uric are valori între 2,5—5 mg% (concentrație medie 4,2 mg%). Repartiția acidului uric între globule și plasmă este în funcție de pH. In lichidul cefalorahidian se găsesc cantități mici de acid uric. Când valoarea acidului uric din sânge crește peste un anumit nivel, este eliminat cu o viteză mai mare. Salicilații, sărurile de litiu, măresc excreția de acid uric.

Guta este o afecțiune caracterizată printr'o depozitare de acid uric și urați în stare solidă în țesuturi, în special în cartilaje, tendoane, în articulații, constituind *tofii*. Boala este caracterizată prin crize în care cristalele de acid uric sunt acumulate și produc reacții inflamatorii la nivelul articulațiilor. Uneori depozitele dispar, sunt resorbite, alteori inflamațiile devin cronice, provocând deformații. In gută, concentrația acidului uric din sânge este, în general, crescută, dar nu există o relație între valoarea uricemiei și intensitatea bolii.

Acidul uric poate avea valori crescute și în alte afecțiuni, și anume în leucemii, nefrite. Injecții cu uricază ar da rezultate în guta umană.

Trecerea dela baze purinice la acid uric (respectiv alantoină)





METABOLISMUL MINERAL

Mineralele ca atare nu iau parte în mod direct la fenomenele energetice din organism, dar rolul lor este fundamental și multiplu:

1. *rol plastic*;
2. *rol în reglarea presiunii osmotice*;
3. *acțiune asupra coloizilor* din organism. Această din urmă acțiune determină la rândul ei acțiunea specifică a diverselor componente cu structură coloidală din organism, cum sunt de exemplu enzimele.

Substanțele minerale din organism sunt: apa, sărurile minerale și gazele.

Elementele care intră în structura corpului și cantitățile lor relative sunt redate în tabelul 26.

Tabelul 26

	Procente	Cantități aproximative în grame la un om de 70 kg
Oxigen	65,04	45,500
Carbon	18,25	12,600
Hidrogen	10,05	7,000
Azot	3,05	2,100
Calciu	1,60	1,050
Fosfor	1,0	700
Potasiu	0,35	245
Sulf	0,25	175
Sodiu	0,15	105
Clor	0,15	105
Magneziu	0,05	35
Fier	0,004	3
Cupru	0,0002	0,1
Mangan	0,0003	0,2
Iod	0,00004	0,03

Mai există unele elemente în cantități extrem de mici, așa numiții *infiniți mici* ai lui Bertrand (Zn, A_1, F_1, Si, Li, Br, As, Pb, Mo, Va), oligoelemente. Se știe acum că aceste elemente nu sunt absolut identice în organism, ci sub formă de amestecuri de izotopi, ceeace explică dece organismul realizează reacțiile biologice în mod identic pentru un anumit element și izotopul lui. Acest fapt am văzut că a fost folosit în studiul metabolismelor cu ajutorul izotopilor. Elementele minerale din organism au origini diverse. Vom analiza pe rând aceste minerale.

APA

Printre componentele anorganice, apa are un rol primordial. Apa intră în constituția oricărei celule și ea reprezintă mediul în care se petrec toate fenomenele chimice și fizicochimice ale vieții. Prin ionii săi H^+ și OH^- participă la toate reacțiile din organism. Apa formează aproximativ 63% din greutatea corpului. Cantitatea variază cu vârsta. La embrion, 94% din greutate este apă, la nou născut 66—68%, la adult 58—65%. Scade deci cu vârsta. O pierdere de aproximativ 15% din totalitatea apei din organism nu mai este compatibilă cu viața. Diversele organe și țesuturi au un conținut diferit în apă. Bogate în apă sunt lichidele și secrețiile din organism, de exemplu bila 86%, sucul intestinal 97%, lacrimile 98%, etc.

Origina apei în organism

Origina exogenă. Aportul exterior de apă prin alimentație lichidă sau solidă este indispensabil. Necesitatea zilnică la adult este de 35 grame pe kilocorp, la nou născut de 140 g, și se traduce fiziologic prin senzația de sete, provocată la rândul ei de creșterea presiunii osmotice a mediului intern.

Origina endogenă. Oxidarea compușilor cu hidrogen (glucide, lipide, protide). Acesta este însă un aport minim. Din acestea, grăsimile produc cea mai mare cantitate de apă : 100 g grăsimi dau 107 g apă ; 100 g amidon dau numai 55,5 g și 100 g proteine, 41,3 g apă.

Formele de eliminare a apei sunt :

1. apa din urină,
2. apa din materiile fecale,
3. vaporii de apă prin respirație,
4. transpirația vizibilă,
5. pierderea invizibilă a apei prin piele, așa numita *„perspiratio insensibilis"*, care poate atinge la adult 400—700 cc zilnic.

Cele mai importante rezerve de apă din organism sunt mușchiul și pielea.

Forma sub care se găsește apa în organism. Apa se găsește în organism sub trei forme :

1. *ca apă de circulație*, intravasculară, constituind elementul lichid al sângelui și limfei ;
2. *ca apă lacunară*, apa de rezervă a interstițiilor celulare, a cavităților seroase, a spațiilor interorganice ;
3. *ca apă de constituție*, legată în celulă fie chimic, ca apă de hidratare, fie cu sistemele coloidale, ca apă de imbibiție. Intre apa de circulație și apa din țesuturi există un schimb continuu în ambele sensuri.

Scanned with OKEN Scanner

Forţele care dirijează mişcarea apei în organism sunt :
1. presiunea mecanică a inimii,
2. fenomenele osmotice, presiunea osmotică şi oncotică (coloid-osmotică),
3. presiunea de difuziune,
4. mecanismele secretorii ale pereţilor capilarelor,
5. fenomenele de imbibiţie.

Eliminarea apei se face prin :
1. rinichi (apa din urină),
2. intestin (apa din fecale),
3. plămân (apa eliminată ca vapori de apă şi în acest caz se elimină apă pură, fără substanţe disolvate în ea),
4. transpiraţia vizibilă,
5. transpiraţia invizibilă (perspiratio insensibilis), pierderea invizibilă prin piele, datorită unui fenomen de osmoză sau difuziune.

Reglarea cantităţii de apă din organism

Cantitatea de apă din organism are o mare stabilitate şi este în funcţie de conţinutul în săruri din organism şi de afinitatea coloizilor tisulari pentru apă.

Sărurile influenţează cantitatea de apă din organism prin acţiunea pe care o au asupra presiunii osmotice a mediului intern. Presiunea osmotică reglează la rândul ei circulaţia apei în organism. In special NaCl are un rol fundamental. Pentru menţinerea presiunii osmotice, orice eliminare sau reţinere de săruri duce la o reţinere sau eliminare de apă.

Factorii care influenţează presiunea osmotică a mediului intern sunt :
— un exces de eliminare sau
— un exces de aport de săruri minerale.

a) *Excesul de eliminare* poate fi datorit unui exces de *excreţie renală*. Pragul renal care reglează excreţia urinară a apei este sub dependenţa hormonilor, şi anume a *pituitrinei*, hormonul retrohipofizar, precum şi a hormonilor cortexului. Leziuni ale lobului posterior al hipofizei conduc la un sindrom cunoscut sub numele de diabet insipid, caracterizat printr'o poliurie care poate atinge 10,15 şi chiar 20 de litri pe zi.

O eliminare cutanată mare prin transpiraţie poate duce deasemenea la o creştere a presiunii osmotice.

Diareea deasemenea poate duce la o stare de deshidratare.

b) *Excesul de aport de săruri minerale* poate duce la o creştere a presiunii osmotice, ca şi creşterea eliminării de apă. Sărurile influenţează şi al doilea mecanism de reglare, şi anume : afinitatea coloizilor tisulari pentru apă. Intregul metabolism al apei este astfel condiţionat de acela al electrolitelor. Transportul apei ingerate nu se face direct din intestin în ţesuturi şi de aci în rinichi, ci prin intermediul sângelui. La o jumătate de oră după ingerare are loc o acumulare de apă în sânge, acumulare care dispare după 4—5 ore. In acest interval are loc o depozitare a apei în anumite regiuni, în special în ţesutul conjunctiv, muşchi, piele. Din aceste depozite, apa este eliberată după necesităţile imediate ale organismului. Organele de reglare prin eliminare, şi anume rinichiul, intestinul, plămânul, etc., intervin abia ulterior. Ţesuturile intervin însă în mecanismul de reglare prin capacitatea de imbibare şi desimbibare a coloizilor tisulari.

Scanned with OKEN Scanner

Reglarea apei prin diversele mecanisme este sub dependenţă neurohormonală.

Devieri patologice ale metabolismului apei pot fi în sensul 1) *unei scăderi a cantităţii de apă din organism*, sau 2) *în sensul unei acumulări, unei reţineri patologice de apă în organism.*

1. Scăderea poate fi datorită unui aport insuficient de apă din exterior sau unei eliminări excesive.

2. Reţinerile exagerate de apă se fac de obicei în ţesuturi şi în special în ţesutul celular subcutanat, ceeace duce la formare de edeme.

Cauzele care produc edeme sunt:

1. *creşterea presiunii hidrostatice* din capilarele sanguine, ceeace duce la un aport prea mare de apă în ţesuturi;

2. *scăderea presiunii coloidosmotice* (presiunii oncotice) din capilare, ceeace face ca apa din ţesuturi să nu mai fie atrasă;

3. *scăderea presiunii osmotice în capilare* face ca apa din ţesuturi să nu fie atrasă.

In general, orice cauză care va influenţa capacitatea de imbibare şi desimbibare a coloizilor tisulari va putea duce sau nu la formare de edeme. Edemul este o stare patologică datorită unei retenţii exagerate de apă în ţesuturi.

Formarea edemelor este datorită unor cauze multiple: pH-ul scăzut, acumularea de ioni H^+ ar produce edeme (în acidoze locale există edem), valoarea raportului $\frac{\text{albumină}}{\text{globulină}}$ din plasma sanguină, ionii Na^+, Mg^{++} ar fi inhibitori ai diurezei prin stimularea capacităţii de imbibiţie a proteinelor. Ionii Ca^{++} şi K^+ acţionează în sens invers. Metabolismul ionilor dirijează metabolismul apei, şi se crede că în formarea edemelor ar interveni un echilibru Donnan.

Rolul apei în organism este multiplu:

1. *rol plastic* (ca material de construcţie);

2. *mediu general de reacţie*:

a) prin ionii H^+ şi OH^- intervine în reacţiile de tamponare, de hidroliză, de cataliză;

b) prin marea ei putere de solubilizare permite formarea soluţiilor adevărate şi coloidale;

c) prin constanta dielectrică mare permite o disociere electrolitică în ioni a diverselor substanţe şi astfel reacţiile lor chimice;

d) intră ea însăşi în reacţii (de hidroliză, oxidări, etc.);

3. *ca mediu de transport*: este mediul de vehiculare a substanţelor în organism.

4. *ca reglator de temperatură* (prin evaporare cutanată şi eliminare prin respiraţie).

SĂRURILE

Cantitatea de substanţe minerale din organism reprezintă cam 4,7% din greutatea corporală. Conţinutul în substanţe minerale variază cu ţesutul; cea mai mare cantitate se găseşte în smaltul dinţilor (96%); apoi în oase (95%), cartilaje (3,4%), muşchi (1,5%) ficat, pancreas (1%), splină (0,5%), rinichi (0,1%), plasmă sanguină (0,8%).

Vom analiza elementele minerale mai importante.

Scanned with OKEN Scanner

Clorul

Clorul este ingerat în special sub formă de NaCl. Cl se găseşte în special în lichidele din organism (sânge, lichid cefalorahidian, limfă). Organismul adult conţine 100 g cloruri. Globulele roşii conţin mai puţin Cl decât plasma: 1,7—1,8 g% în globule, 3,5—3,6% în plasmă. Repartiţia Cl în sânge şi lichid cefalorahidian, limfă şi lichid de edeme, globule roşii şi plasmă este dirijată de un echilibru Donnan. Organul reglator cel mai important al clorului în organism este reprezentat de ţesutul conjunctiv subcutanat şi de rinichi, aceste sisteme de reglare fiind supuse la rândul lor unei reglări neuro-hormonale, legate de mecanismul de reglare a apei. Metabolismul clorului a fost studiat cu ajutorul clorului izotop (^{38}Cl).

Rolul clorului în organism

1. **Reglarea presiunii osmotice.** Clorul participă la reglarea presiunii osmotice (sub forma de NaCl). Acest lucru se datoreşte faptului că reprezintă aproximativ două treimi din totalitatea anionilor din plasmă. Eliminarea clorurilor are un *„prag de eliminare renală"*: când clorul sanguin se ridică peste o anumită valoare, se elimină activ prin urină; invers, când e sub o anumită valoare, eliminarea este lentă; astfel se menţine presiunea osmotică a mediului intern. O insuficienţă renală poate duce la o retenţie de clor, ceeace aduce după sine o retenţie de apă pentru a menţine presiunea osmotică constantă, deci edeme (aşa se explică nefritele hidropigene). Deasemenea, o scădere a Cl sanguin poate duce la o creştere a ureei sanguine ca efect de compensare, constituind uremiile prin lipsă de săruri, care cedează prin aport de NaCl. Există deci antagonism între Cl şi uree.

2. **Menţinerea echilibrului acido-bazic.** Clorul ar avea o mare mobilitate şi poate pătrunde uşor în ţesuturi, unde deplasează din sărurile lor alţi acizi mai slabi. Prin aceasta, el e neutralizat şi apar liberi în soluţie acizii mai slabi, deci aciditate mai slabă. Acest mecanism are loc în procesul de schimb de Cl^- dintre globulul roşu şi plasmă, schimb care este dependent de tensiunea CO_2 din plasmă, respectiv a ionului bicarbonic. Când tensiunea bioxidului de carbon din sânge creşte, clorul trece din plasmă în g obulul roşu, înlocueşte ionul bicarbonic din sărurile lui alcaline şi îl eliberează. Deci, în locul unui acid tare, HCl, apare un acid slab, CO_3H_2; invers, când tensiunea CO_2 scade, ionul Cl^- iese din globulul roşu în plasmă (acest schimb e dirijat de un echilibru Donnan). In felul acesta se menţine echilibrul acido-bazic intact.

3. **Secreţia gastrică**: pH-ul sucului gastric trebue să se menţină în jurul valorii 1,5-2, valori care reprezintă pH-ul de optimă activitate a pepsinei. Acest pH e menţinut graţie prezenţei HCl în sucul gastric. Acidul clorhidric provine din clorurile din organism şi în special din NaCl din sânge şi ţesuturi; în timpul secreţiei gastrice se constată în sânge o scădere a clorurilor şi o creştere a bicarbonaţilor, ionii de clor sunt cedaţi de sânge pentru a forma HCl, iar ionii Na^+ din cloruri au fost fixaţi de ionii CO_3H^-. Acest fenomen se petrece tot printr'un schimb de ioni dirijat de un echilibru Donnan, ca şi între globule şi plasmă.

Scindarea ionului Cl^- acid şi a ionului Na^+ alcalin s'ar face în peretele stomacal, în celulele marginale. Acest Cl^- e neutralizat ulterior de secreţia

Scanned with OKEN Scanner

alcalină din duoden, reformând NaCl, pe care intestinul o absoarbe și o trece din nou sângelui :

Cl în globule = 1,7 — 1,8‰ ;

Cl în plasmă = 3,5 — 3,6‰.

Ionul Cl^- e un activator al amilazei salivare.

Sodiul — Na^-

Predomină în lichidele din organism, în lichidele extracelulare, plasma sanguină, lichidul intestinal. Organismul uman adult conține aproximativ 100 g Na. E introdus în organism în special cu ionul Cl. Are, ca și Cl, rol în reglarea *presiunii osmotice* și a *echilibrului acido-bazic.* Are un rol important în imbibiția țesuturilor și deci în reglarea apei în organism. Mișcarea Na în organism este reglată de factori fizico-chimici : presiune osmotică, echilibru acido-bazic, permeabilitate prin membrană.

S'a utilizat ^{24}Na radioactiv ca o măsură de determinare a fluidului extracelular în organismul animal, presupunând că există numai în aceste lichide și nu și în interiorul celulei.

Excreția zilnică de Na e de vreo 4 — 5 g (10 — 12 g NaCl) și în funcție de NaCl din alimentație.

Serul conține 3,4 g% sodiu.

Globulele roșii 0,2 g%.

Lipsa de Na din alimentația șobolanului produce o întârziere a creșterii și turburări ale funcțiilor de reproducție. Folosirea Na izotop radioactiv indică o absorbție rapidă a acestui element din tractul gastro-intestinal și mai puțin din stomac.

Ionul Na^+ este ionul predominant din plasma sanguină și contribue în proporție de 92% la menținerea presiunii osmotice.

Potasiul K^-

Organismul adult conține 250 g potasiu care, spre deosebire de sodiu, predomină sub forma de ion K^+ în celule și țesuturi și nu în lichidele din organism. Astfel, plasma conține 0,21 g K%, globulele 3,329 g%. Excreția, atât a Na, cât și a K, se face exclusiv prin rinichi.

Rolul potasiului

Este multiplu. Are rol în *menținerea echilibrului acido-bazic.* Datorită marii sale permeabilități, are un rol important în *metabolismul glucidic,* în special la nivelul mușchiului, a cărei contracție e întovărășită de variații ale fibrilelor în potasiu, care intervine în transferul enzimatic al grupării fosfat puternic energetică de pe ATF pe acidul piruvic. Are rol important în menținerea *automatismului cardiac.* Se credea că acest lucru e datorită radioactivității potasiului natural (Zwardenker). Se pare însă că e vorba de un antagonism potasiu — calciu și de un anumit echilibru K/Ca, echilibru care este extrem de important în funcția inimii. Există deasemenea o relație importantă între K și *secreția adrenalinică.* Intervine în *funcția sistemului nervos vegetativ,* unde are deasemenea acțiune antagonistă cu Ca. Există deasemenea un antagonism cu Na. Echilibrul Na/K este dirijat de hormonii corticosuprarenali ; astfel, în boala lui Addison există

Scanned with OKEN Scanner

un desechilibru care poate fi restabilit printr'un aport de săruri de sodiu în exces şi scăderea la maxim a aportului de săruri de potasiu.

Calciul

Calciul este un constituent al tuturor celulelor. Reprezintă aproximativ 2% din greutatea totală a organismului adult şi aproximativ 99% se găseşte în ţesutul osos. Muşchiul conţine aproximativ 8 mg% (substanţă umedă), plasma sau serul între 9—11,5 mg%. Globulele roşii conţin cantităţi foarte mici, sângele total 4,5—6 mg%. In limfă, umoarea apoasă, lichidele de ascită şi de edem sunt cantităţi mai mici, în lichidul cefalorahidian 5 mg% (egal cu fracţiunea difuzibilă din plasmă). Necesitatea organismului în calciu e de aproximativ 0,8 g zilnic. Ea depinde însă de raportul dintre P şi Ca din alimentaţie şi de factori accesorii, cum sunt vitamina D şi starea hormonală a indivizilor; la copiii în creştere, cantitatea necesară este dublă.

Carenţa în calciu poate duce la turburări grave. Cantitatea cea mai mare de calciu se găseşte în ţesutul osos: 1 kg la un individ de 60 kg. Este o componentă importantă a fiecărui organ.

Calciul din sânge se găseşte sub forme diverse şi anume:

1. ionizabil 4,75—6,25 mg%;
2. difuzibil 5,0—6,50 mg%;
3. neionizabil — combinat cu coloizii din ser, 0,25 mg%.

Calciul liber din ser variază între 9,5—12,7 mg%.

Cantitatea de calciu nedifuzibil este în funcţie de conţinutul în proteine. O scădere a proteinelor duce la hipocalcemie. Ionizarea calciului în plasmă este în funcţie de raportul calciu/proteină şi ar urma legea acţiunii masselor, conform relaţiei:

$$\frac{Ca^{++} \times Prot.}{Ca\ Prot.} = K$$

Căile de eliminare a calciului sanguin sunt: prin urină, prin intestin, şi prin depozitare în oase.

Rolul calciului este multiplu. Are un *rol plastic* (formarea oaselor). Are un rol dinamic în *permeabilitatea membranelor*, în *metabolismul hidric*. Este o componentă necesară în anumite fenomene enzimatice, cum ar fi *coagularea sanguină*, precipitarea cazeinei de către labferment, activarea amilazei, a tripsinogenului, a adenozintrifosfatazei.

Are acţiune asupra *mecanismului neuro-muscular*; scăderea calciului sanguin (de exemplu, sub 3 mg/100 cc) provoacă fenomene tetanice.

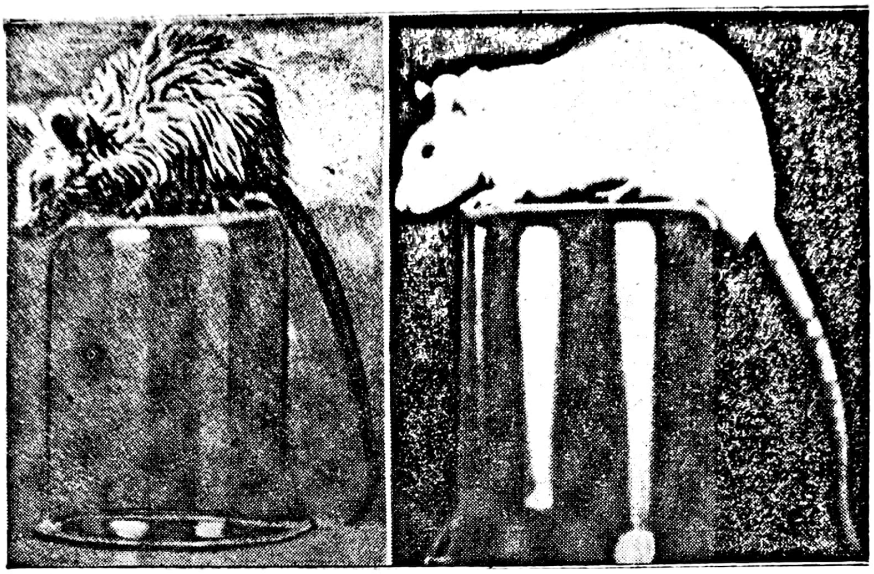
Aportul excesiv de săruri de calciu poate duce la fenomene de intoxicare. Asimilarea calciului depinde în primul rând de proporţia de fosfor care întovărăşeşte calciul din alimentaţie.

Reglarea metabolismului calciului este sub influenţa hormonilor (hormonul hipofizar şi în special parathormonul — hormonul paratiroidei), a vitaminelor D care reglează utilizarea şi absorbţia Ca, a vitaminelor A şi C care influenţează depozitarea Ca. Deoarece metabolismul calciului este strâns legat de cel al fosforului, el este dependent şi de sistemul enzimatic al fosfatazelor care reglează metabolismul. Laptele, oăle, sunt bogate în calciu.

Scanned with OKEN Scanner

Magneziul

Magneziul se găseşte în toate celulele, dar în special în oase şi în muşchi; aproximativ 71% din Mg din organism se găseşte în oase. Metabolismul său e legat de acela al calciului. Un nivel de 20 mg% Mg în sânge produce anestezie, probabil datorită acţiunii asupra sistemului nervos central.



A B

a) Şobolan după 54 zile de alimentaţie săracă în magneziu (1,2 mg% aliment); *b*) Acelaş animal după 61 zile dela revenire la o alimentaţie normală.

Fig. 115. Lipsa de magneziu din alimentaţie.

Are un *rol* important de *activator al multor enzime* (fosfatazelor) care intervin în glicoliza musculară şi de inhibitor al altora, de exemplu al adenozintrifosfatazei (fig. 115).

Este indispensabil procesului de reformare a acidului adenozintrifosforic, acţiunii cocarboxilazei. Are rol în *permeabilitatea membranelor celulare.*

Constituent al clorofilei, are rol fundamental în construirea compuşilor chimici ai materiei organizate. Necesitatea zilnică în Mg ar fi de 0,43 g la adult.

Magneziul are acţiune fiziologic antagonistă cu calciul într'o serie de fenomene.

Fierul

Fierul este un element mineral indispensabil în structura hemoglobinei, a unor enzime, catalaze, peroxidaze, citocromoxidaze, etc. S'ar găsi în ficat ca $Fe(OH)_3$ coloidal în combinaţie cu o proteină, formând feritina. Necesitatea zilnică în fier ar fi de 12 mg la adult şi de 6—15 mg zilnic la copii. Folosirea Fe radioactiv în experienţele pe anima a ind cat o rapidă incorporare a acestuia în globulul roşu, în aproximat v 24 de ore.

Cuprul

Cuprul are rolul de *activator în formarea hemoglobinei*. Este o componentă a unor enzime: tirozimaza, acid ascorbicoxidaza. E un element

indispensabil în organism. Hemocianina, pigmentul sanguin al nevertebratelor, conține cupru.

Manganul

Are rol de *stimulare a activității celulare.* Ar intra în structura unor enzime (ca arginaza). Experiențe cu Mn radioactiv indică o excreție a acestuia în ficat și bilă.

Zincul

Zincul este un element esențial. Este un constituent al enzimei acid carbonicanhidraza, în proporție de 0,2—0,3%. Este un constituent al insulinei cristalizate, dar nu și al insulinei amorfe.

Cobaltul

Cobaltul este un activator al unor enzime (arginaza). Este prezent în țesuturile animale în cantități mici. Studiul cu cobalt radioactiv indică o absorbție rapidă a acestuia și o eliminare prin rinichi.

In genere, o serie de metale (Ca, Ni, Zn), în cantități extrem de mici, au un rol fundamental în fenomenele vitale, constituind așa numitele *elemente oligodinamice* sau infiniții mici ai lui Bertrand.

Fluorul

Fluorul se găsește în special în țesuturile cu vitalitate redusă (dinți, oase, cartilaje, tendoane). Se atribue fluorului un *rol în prevenirea cariilor dentare*; în concentrație prea mare produce fluoroza dentară. Fluorul, în concentrații anumite, este un *inhibitor al unor enzime* (enzime ale degradării glucidelor).

Iodul

Organismul uman conține aproximativ 25 mg I; fiecare organ conține urme de iod, în special glandele și din acestea tiroida (15 mg), unde se găsește sub formă de complex, constituind tiroxina.

Folosirea iodului radioactiv în experiențele in vitro pe secțiuni de tiroidă au indicat o incorporare a I în diiodotirozină și tiroxină. Tiroida are proprietatea de a extrage iodul din curentul sanguin, a-l concentra în celule și a-l depozita în coloid. In fixarea iodului radioactiv de către glanda tiroidă există diferențe între indivizii normali, hiper- și hipotiroidieni.

Tot cu ajutorul acestei metode s'a constatat acțiunea de inhibare pe care o exercită sulfamidele asupra transformării în organism a iodului anorganic în iod organic, fapt care explică consecințele administrării de sulfamide, și anume, hiperplazie și hiperfuncție tiroidiană.

Valorile normale de iod în ser sunt între 5—12 micrograme la 100 cc după unii cercetători; după alții, 4—7,5 micrograme. Există două metode pentru controlul funcției tiroide cu iod radioactiv, ^{131}I. Intr'o metodă se controlează excreția urinară a izotopului și aceasta indică funcția totală

a glandei. In altă metodă se determină direct repartizarea parțială a iodului în glandă, cu ajutorul unui contor. Se constată o repartizare uniformă la indivizii normali și inegală în cazuri patologice.

Necesitatea zilnică este de 100—150 γ g la adult. In regiunile depărtate de mare sau în regiuni muntoase, deci unde atmosfera e săracă în iod, apare frecvent guşa endemică.

Sulful

Se găseşte în special combinat sub formă de compuşi organici : tiocianat în salivă, acid taurocolic în bilă, cisteină, cistină, glutation, etc.

Fosforul

Este o componentă a multor compuşi esenţiali. E adus cu alimentele sub formă de compuşi organici, esteri fosforici. Prin digestie se face scindarea radicalului fosforic, care e metabolizat mai departe prin combinarea cu componente minerale sau cu componente organice. Ambele tipuri de compuşi sunt indispensabili organismului. Astfel, sărurile de calciu şi magneziu sunt componenţii esenţiali ai oaselor, sărurile de sodiu şi potasiu au un rol esenţial în menţinerea echilibrului acidobazic ; sub formă de esteri fosforici organici au un rol esenţial în metabolismul glucidelor (esteri fosforici, fosfagen), lipidelor (fosfolipide) şi nucleoproteidelor (acid adenilic) ; intră în structura multor enzime.

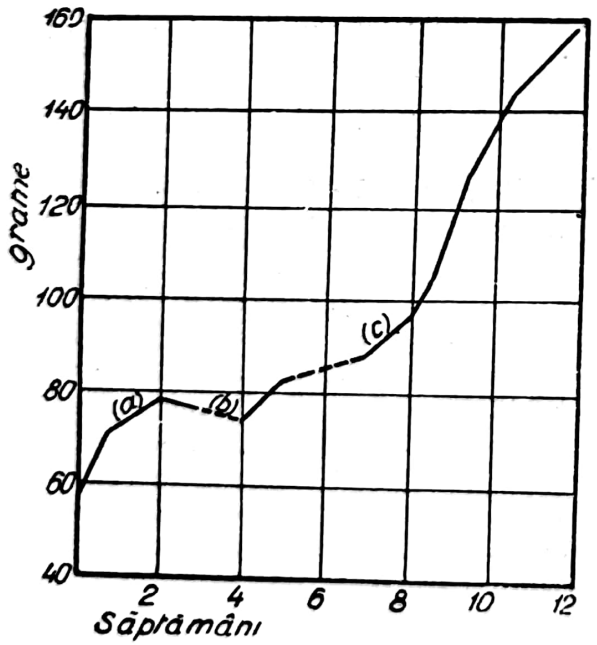
Rolul fosforului în organism

este deci multiplu.

1. *Ca element plastic* (fig. 116) împreună cu Ca şi Mg ia parte la formarea oaselor, dinţilor. Sub formă de lipofosfatide ia parte la formarea membranelor celulare.

2. Intervine în diversele etape ale *contracţiei musculare*, sub formă de esteri fosforici.

3. Are rol în *degradarea glucidelor şi lipidelor*.



a = dietă fără Ca şi P *b* = dietă a + fosfat alcalin
c = dietă a + fosfat alcalin + Ca

Fig. 116. Curba de creştere la şobolan cu şi fără calciu şi fosfor în alimentaţie.

Conţinutul P total din sânge variază între 300 — 400 $mg^0/_{00}$. P mineral este egal repartizat între globule şi plasmă (36 $mg^0/_{00}$ sânge) şi e format din ortofosfaţi şi pirofosfaţi.

Variaţiile fiziologice ale P sanguin sunt sub dependenţa parathormonului care controlează excreţia renală a fosfaţilor. Valorile P cresc în timpul travaliului muscular. Variaţii patologice se înregistrează în nefrite, în rahitism, când are loc o scădere a P care poate atinge

Scanned with OKEN Scanner

valoarea de 50 — 60 mg $/_{00}$; scăderea nu e corelată cu a calciului. In tetania experimentală cu ablaţia paratiroidei are loc o creştere a P până la 125 mg $/_{00}$. P izotop radioactiv este folosit în tratamentul unor boli. Vom vedea în alt capitol rolul P în formarea oaselor. Necesitatea zilnică în P = 1,5 g.

ANTAGONISMUL IONIC

O serie întreagă de fenomene vitale sunt influenţate în mod antagonist de diverşii ioni minerali. Celula vie nu poate trăi decât dacă mediul extern conţine toate componentele indispensabile vieţii celulare, şi dacă aceste componente sunt în raporturi echilibrate. Fenomenul este evident în ceeace priveşte diverşii ioni şi se explică prin acţiunea pe care o au aceştia asupra coloidelor proteice din care este constituită substanţa vie. Stabilitatea sistemelor coloidale, în general, şi a substanţelor proteice, în special, prin caracterul lor coloidal şi amfoter, este extraordinar de sensibilă la reacţiile ionice din mediul înconjurător, la modificările de echilibru dintre aceşti ioni. Astfel, diverşi ioni pot avea, individual, o acţiune toxică; în amestec, îşi suprimă această acţiune. Cel mai clasic exemplu de antagonism ionic este acela al ionilor Ca^{++} şi K^{+}, fenomen care a fost observat prima oară la inima de broască. Inima de broască perfuzată cu sânge continuă să bată normal câteva ore; perfuzată cu o soluţie fiziologică ce conţine KCl se constată o scădere bruscă a contracţiilor normale şi apoi se opreşte în diastolă (prin epuizare); dacă se adaugă $CaCl_2$ în loc de KCl, acţiunea e contrară. Contracţiile cresc mult şi inima se opreşte în sistolă. Calciul şi potasiul au deci acţiune antagonistă. Puse în amestec, inima bate normal, deci ele îşi suprimă reciproc toxicitatea, îşi compensează efectul. Acţiunea antagonistă a K şi Ca se explică prin acţiunea antagonistă pe care o au asupra coloizilor tisulari : K stimulează imbibiţia coloidală, iar Ca desimbibiţia, făcând mai puţin permeabile membranele pentru soluţii toxice, ceeace explică acţiunea lui în diversele boli.

Trebue ca în sistem ionii să fie astfel echilibraţi, încât să nu modifice structura coloidală a substanţei vii. Hoffmeister a stabilit o serie a cationilor şi anionilor după intensitatea acţiunii pe care o au asupra imbibiţiei, floculării sau gelificării coloizilor plasmatici

Pentru anioni

$$SO_4^{--} < PO_4H^{--} < Cl^{-} < Br^{-} < NO_3^{-} < I^{-} < SCN^{-} < OH^{-}$$

Pentru cationi

$$Li^{+},\ Na^{+},\ K^{+},\ NH_4^{+} < Ca^{++},\ Mg^{++},\ < Zn^{++} < Al^{+++} < Hg^{+},\ Ag^{+},\ H^{+}$$

Pentru ca o soluţie salină să nu fie toxică, trebue ca în sistem să existe ioni care să se compenseze reciproc; acest lucru a dus la noţiunea de soluţii fiziologic echilibrate, în care diverşii ioni îşi compensează reciproc toxicitatea individuală.

Serul sanguin este tipul unei soluţii fiziologic echilibrate; aşa zisele soluţii artificiale (soluţie Ringer, Tyrode, Locke, etc.) iau ca tip constituţia acestuia.

Scanned with OKEN Scanner

Dăm formulele unora din soluțiile fiziologic echilibrate care se folosesc în special în experiențele biologice pe țesuturi sau organe izolate (vezi tabelul 27).

Tabelul 27

	Soluția Ringer	Soluția Locke	Soluția Tyrode
Na Cl	0,900	0,900	0,900
K Cl	0,040	0,042	0,02
Ca Cl_2	0,025	0,024	0,02
Mg Cl_2	—	—	0,01
Glucoză	—	0,1	0,1
CO_3HNa	0,020	0,020	0,1
PO_4H_2Na	—	—	0,005

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL V

BIOCHIMIA CELULEI ŞI A ŢESUTURILOR

CELULA

După concepţia virchovistă, viaţa începe numai odată cu celula. Concepţia materialist-dialectică se opune, prin Engels, complect acestui punct de vedere afirmând că nu numai celula prezintă fenomenele vieţii şi că aceste fenomene apar ori de câte ori se află „un corp albuminos care nu este în stare de descompunere" (F. Engels, Anti-Dühring). Una din problemele cele mai importante este astfel studiul genezei celulei din substanţa vie. Acest studiu cuprinde cele două etape, şi anume :

„1. formarea protoplasmei sau, mai precis, a substanţei vii din materia anorganică şi

2. formarea celulelor din substanţa vie"[1].

Studiul proteinelor, respectiv al protoplasmei, este o preocupare de prim ordin a biochimiei, iar geneza celulelor din substanţa vie este problema de bază a embriologiei. Această problemă a fost urmărită cu rezultate extrem de interesante de O. B. Lepeşinscaia ; ele vor fi expuse în detaliu la sfârşitul capitolului asupra biochimiei celulei.

Structura chimică a celulei

La fiinţele superioare şi în special la om, celulele sunt diferenţiate şi specializate funcţional. Constituenţii de bază sunt însă aceeaşi pentru toate celulele şi anume : protidele, glucidele, lipidele şi mineralele. Deosebirea dintre ele rezidă în raporturile dintre componente, în enzimele respective şi în special în raporturile de activitate ale sistemelor enzimatice care sunt caracteristice fiecărei celule (de exemplu arginaza pentru celula hepatică, *d*-aminooxidazele pentru celula renală, etc.).

Celula este constituită dintr'un nucleu în jurul căruia se află citoplasma care formează o pătură mai mult sau mai puţin groasă. Ea conţine nucleoli, vacuole şi granulaţii.

Membrane diferenţiate histologic s'au constatat numai la celulele vegetale, unde sunt de structură celulozică. Pentru celula animală şi în

[1]) *O. B. Lepeşinscaia*, Geneza celulelor din susbtanţa vie şi rolul substanţei vii în organism, ed. rom. 1952.

Scanned with OKEN Scanner

special la om nu s'a reuşit identificarea histologică a unei membrane celulare.

Nu se cunoaşte încă structura chimică exactă a nucleului, citoplasmei, nucleolilor, vacuolelor, granulaţiilor; în ultimii ani, folosirea unor metode de cercetare mai fine (absorbţia în ultraviolet, raze X, izotopi, acţiunea enzimelor specifice) a dus la o serie de rezultate importante, în special în ceeace priveşte componenta nucleoproteidică a celulei. S'a constatat că nucleoproteidele, respectiv acizii nucleici, sunt componentele ei de bază.

Punerea în evidenţă a acizilor nucleici a fost făcută pe diverse căi, şi anume: cu ajutorul benzilor de absorbţie în ultraviolet a bazelor purinice şi pirimidinice care au un maxim la 2650 Å; cu ajutorul reactivilor specifici (reacţia Feulgen, reacţia Dische), cu ajutorul enzimelor specifice (Bruchet). Prezenţa unor cantităţi importante de acizi nucleici a fost pusă în evidenţă prin determinarea benzii de absorbţie în ultraviolet (2650 Å); această metodă nu diferenţiază însă tipul de acid nucleic. Diferenţierea lor s'a făcut cu ajutorul reactivului Feulgen şi Dische şi cu ajutorul enzimelor specifice.

Reacţia Feulgen foloseşte ca principiu de bază proprietatea acidului desoxiribonucleic (ADRN), respectiv a desoxiribozei din moleculă, de a recolora fuxina prealabil decolorată de anhidrida sulfuroasă. Acizii ribonucleici nu au această proprietate, care permite astfel diferenţierea celor două tipuri de acizi nucleici.

Reacţia Dische e bazată pe proprietatea acizilor desoxiribonucleici de a da o coloraţie albastră cu difenilamine, proprietate datorită deasemenea prezenţei desoxiribozei în moleculă, şi deci diferenţiază acizii desoxiribonucleici de cei ribonucleici.

Folosirea ribonucleazei (Bruchet) şi desoxiribonucleazei permite localizarea în celulă a substratului specific al acestor enzime acidul ribonucleic, respectiv desoxiribonucleic.

Folosirea microscopului electronic, a spectrografiei cu raze X a permis identificarea constituenţilor celulari, iar ultracentrifugarea a permis separarea acestor constituenţi (microzomi, mitocondri, etc.).

Folosirea ^{32}P izotop a permis urmărirea sintezei acizilor nucleici în celulă.

Citop'asma celulară este formată în special din protide şi lipide sub formă de cenapse lipido-proteidice (fig. 117); ele conţin polinucleotide *d*-ribozice combinate cu fosfolipidele, constituind împreună granulaţiile. Particulele cu dimensiuni între 0,5—2 μ se numesc *mitocondri*, cele cu dimensiuni între 50—200 mμ poartă numele de *microzomi*. Aceste particule se pot separa între ele prin ultracentrifugare. Granulaţiile sunt sediul unei activităţi enzimatice intense, sunt capabile de a realiza diverse sinteze şi în special sinteza proteinelor citoplasmatice.

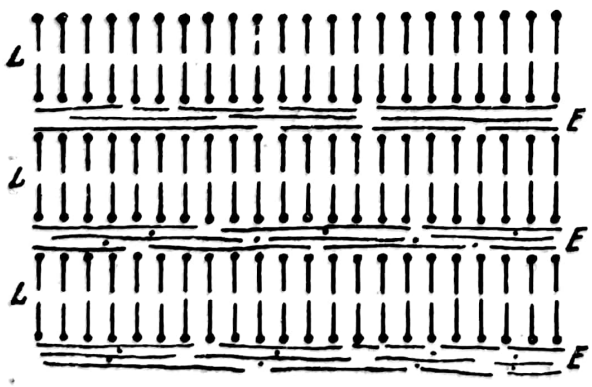


Fig. 117. Sistemul proteine-lipide

Nucleul tuturor celulelor animale este constituit din acizi desoxiribonucleici (ADRN) şi a protei-

nei cu caracter acid, *cromozomina* bogată în triptofan. Ea este constituentul de bază al cromozomilor. Nucleul mai conţine lipide şi substanţe minerale. Cu ajutorul desoxiribonucleazei s'a arătat că acidul desoxiribonucleic există numai în cromatină.

Sucul nuclear conţine proteine bazice combinate cu acizi nucleici. *Nucleolii* conţin acid ribonucleic combinat cu proteine bazice. Afinitatea nucleului pentru coloranţii bazici arată caracterul acid al componentelor sale, iar afinitatea nucleolilor pentru coloranţii acizi pune în evidenţă caracterul bazic al componentelor lor. Determinările de pH în interiorul celulei dau valori între 6—7 pentru protoplasmă, pH datorit acidului carbonic. pH-ul vacuolelor este foarte acid (5,2). Nucleul are un pH aproape de neutralitate; aciditatea care apare pe preparatele histologice este datorită acidificării prin moartea celulei. Celula conţine glucide în cantitate mică; sucul celular conţine minerale.

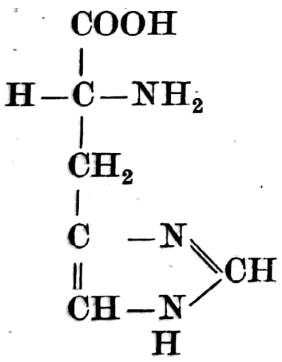
Sinteza acizilor nucleici în celulă

Problema sintezei acizilor nucleici este de primă importanţă, aceste componente fiind constituenţi de bază ai celulei. Cercetările în această direcţie sunt însă încă în stadiul ipotezelor.

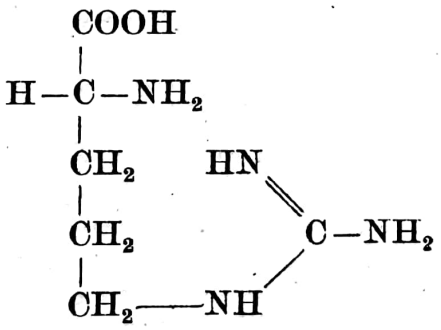
Cu ajutorul ^{32}P izotop radioactiv s'a demonstrat posibilitatea încorporării acestuia în molecula acidului nucleic (Hevsey).

Riboza din molecula acidului ribonucleic ar proveni din catabolismul hexozelor, hexozofosfatul transformându-se în acid ribozofosforic prin decarboxilare oxidativă. In ceeace priveşte desoxiriboza, nu se cunoaşte modul său de formare.

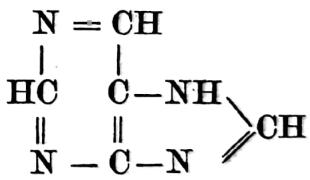
In privinţa sintezei *purinelor* se presupune, în general, că ar rezulta din histidină şi arginină:



histidină



arginină



purină

In celulă, acizii nucleici suferă o continuă reînnoire, fapt dovedit prin studiile cu ^{32}P, care indică o continuă transformare a substanţei din cromozomi, deci un metabolism extrem de activ. *In celula normală, acidul desoxiribonucleic este localizat exclusiv la nivelul cromatinei; în citoplasmă se găsesc în special ribonucleoproteide.* Capacitatea de a sintetiza proteine este strâns legată de conţinutul în acid ribonucleic. Toate celulele care produc proteine în cantitate mare sunt intens bazofile, datorită bogăţiei în acid ribonucleic (pancreas, parotide, mucoasă gastrică). Plasmocitele, cărora li se atribue rolul elaborării globulinelor d n plasma sanguină, au un conţinut mare în acid ribonucleic. Glanda sericigenă a viermelui

de mătase, ce are ca singură funcţie sinteza proteinei care va fi mătasea, este extrem de bogată în acid ribonucleic. Virusurile, microorganismele cu multiplicare extrem de rapidă au un conţinut mare în acizi nucleici. Volutina din levuri şi tripanozomi este constituită din ribonucleoproteide. Granulele viteline conţine substanţă nucleară, membranele granulelor viteline conţin după O. B. Lepeşinscaia acid desoxiribonucleic, adică o componentă a cromatinei. Acidul ribonucleic se găseşte în cantitate mare în orice celulă care secretă proteine sau elaborează proteinele ei proprii în mare cantitate în timpul multiplicării. In celula nervoasă, sinteza proteinelor care are loc în timpul creşterii sau excitaţiei electrice este întovărăşită de o creştere a acidului ribonucleic. Conţinutul în acid ribonucleic poate fi modificat experimental. Stimularea secreţiei hipofizare duce la o creştere a conţinutului în acid ribonucleic.

Controlul localizării acizilor ribonucleici în citoplasmă indică prezenţa lor în formaţiunile bazofile cu structură lamelară prezente în celulele cu activitate secretorie intensă, în ergastoplasmă.

Mitocondriile ar constitui suportul acidului ribonucleic; deasemenea, *nucleolii* conţin acid ribonucleic şi nu acid desoxiribonucleic.

Cromatina conţine în special acid desoxiribonucleic şi puţin acid ribonucleic; acesta din urmă este localizat în special în heterocromatina care dă naştere la nucleoli. Acidul ribonucleic, este un constituent al nucleolilor şi citoplasmei, acidul desoxiribonucleic, al nucleului. Coloraţia preparatelor microscopice cu verde de metil-pironină (verde Unna) indică fixarea verdelui de metil de către acidul timonucleic, iar a pironinei de către acidul ribonucleic; cromatina apare albăstrie, citoplasma roşie. Dacă se lasă să acţioneze ribonucleaza citoplasma şi nucleolii rămân incolori, deoarece acidul ribonucleic a fost depolimerizat sub acţiunea acestei enzime specifice. Cromatina rămâne colorată, şi anume în verde.

Acidul ribonucleic este asociat cu histone în nucleoli şi citoplasmă; se găseşte în heterocromatină şi oriunde are loc o intensă sinteză a proteinelor. Nu se cunoaşte încă în ce chip intervin acizii nucleici în această sinteză. S'a constatat că conţinutul în acid desoxiribonucleic din nucleu are repercusiuni asupra bogăţiei în ribonucleoproteidele din citoplasmă. Ribonucleotidele ar fi legate de granulele în care coexistă cu o serie de enzime proteice şi de oxidoreducere. Diviziunea celulară este legată deasemenea de metabolismul nucleoproteidelor şi este întovărăşită de o sinteză a acidului desoxiribonucleic şi probabil de o distrugere şi simplificare a proteinelor. Simultan, nucleolii dispar şi ergastoplasma se transformă în granulaţii fine în interiorul celulei, cromozomii se îmbogăţesc în acid ribonucleic, şi s'ar putea ca acidul ribonucleic însuşi să fie folosit pentru sinteza acidului desoxiribonucleic. Acidul ribonucleic nu este o substanţă inertă, ci intervine direct în metabolism. S'a arătat că acidul ribonucleic, prezent în citoplasma oălor de *Ursin*, este desaminat în parte în momentul fecundaţiei şi liberează amoniac, care stimulează oxidările celulare şi contribue probabil la sinteza aminoacizilor. Acizii nucleici sunt în continuă transformare în celulă, fapt dovedit cu ajutorul ^{32}P şi ^{15}N care se regăsesc în aceşti acizi. Nucleul purinelor şi pirimidinelor poate fi sintetizat în organism pe seama amoniacului şi catenelor ternare. Ar exista un paralelism permanent între viteza de reînnoire a P din acidul desoxiribonucleic şi fosfataza alcalină a nucleului. Această enzimă, localizată în nucleu, asigură reînnoirea P din acidul ADRN, reînnoire foarte

lentă în raport cu aceea a acidului ARN, cu excepţia organelor unde mitozele sunt mai frecvente.

ARN există în cantităţi mari în nucleolii şi citoplasma tuturor celulelor destinate a sintetiza cantităţi importante de proteine. Astfel, legătura dintre bogăţia în ARN şi aptitudinea de a sintetiza proteine a fost confirmată de o serie de experienţe, de exemplu: în ficat, ARN scade în cursul inaniţiei, în momentul când nu mai există capacitatea de a sintetiza proteine. Stimularea experimentală a secreţiei hipofizare este întovărăşită de o creştere a ARN din celulele hipofizare. Bogăţia excepţională a neuronilor în ARN poate fi corelată cu faptul că prelungirile acestor celule sunt pe cale de continuă creştere. Bacteriile cu capacitate mare de multiplicare sunt şi foarte bogate în ARN. E de remarcat şi faptul că, în cazul desvoltării embrionare, sinteza proteinelor este precedată de un conţinut ridicat în ARN. Deasemenea, la bacteriile în faza de multiplicare, ARN este mai crescut decât în celalalte faze ale ciclului de creştere.

Prin ultracentrifugare s'au izolat din extractele apoase ale embrionului şi ale diverselor organe (Claude) particule fine, microzomii, distincte de mitocondri, care, fiind mai mari, sedimentează la viteze mai mici. Compoziţia chimică este însă apropiată. Aceste particule conţin, în afară de ribonucleotide şi lipide şi enzime respiratorii foarte importante. Microzomii aparţinând diverselor celule (ficat, muşchi, creier, globule roşii, splină, timus, testiculi, hipofiză, pancreas, glande salivare, embrion de găină, ovare, glande sericigene ale insectelor, foi de spanac prezintă o mare analogie din punct de vedere chimic. In general, aproape totalitatea ARN este în microzomi şi mitocondri. Microzomii nu conţin niciodată ADRN, sunt deci exclusiv de origină citoplasmatică. Fixarea acidului ribonucleic în microzomi este labilă. Denaturarea proteinelor cu alcali, acizi, căldură, soluţii saline, desface rapid acidul ribonucleic din microzomi.

Metabolismul ARN este diferit pentru diversele organite care conţin acest acid (mitocondri, microzomi), fapt constatat cu ajutorul ^{32}P, iar capacitatea de încorporare a acestei componente este foarte diferită pentru diverşii constituenţi celulari. Concepţia actuală asupra sintezei proteinelor atribne rolul important în această sinteză granulelor nucleoproteidice; într'adevăr, granulele fiecărui organ conţin o cantitate importantă de proteine specifice acestui organ; aminoacizii marcaţi sunt încorporaţi aproape selectiv în granulele nucleoproteidice, în special în mitocondri, şi acest proces de încorporare este foate intens în celulele în creştere. Granulele mari, mitocondriile, sunt sediul transformărilor legate de sinteza proteinelor şi de utilizarea acidului adenozintrifosforic ca donator de grupări fosfat puternic energetice, deoarece după cum vom vedea, conţin complexul enzimatic necesar acestei sinteze.

Enzimele celulare. Celulele conţin un complex enzimatic extrem de activ, aparţinând tuturor claselor de enzime (hidrolitice, oxidoreductoare, etc.). Prezenţa acestor enzime explică metabolismul activ al celulei. Localizarea enzimelor a fost urmărită pe cale histochimică pe diversele componente structurale ale celulei. Enzimele se găsesc în celule sub forma de combinaţii cu stabilitate variabilă, unele din ele neputând fi izolate decât după o prealabilă autoliză a celulei, altele putând fi separate numai prin mijloace chimice, iar altele prin simplă extracţie apoasă şi ulterioară centrifugare la viteză mare.

Scanned with OKEN Scanner

Particulele celulare izolate prin ultracentrifugare, şi anume microzomii, conţin enzime respiratorii, citocromoxidaze şi succindehidraza, conţin adenozinpirofosfataze. Hidrolazele, şi anume tripsina, catepsina, amilaza, fosfataza alcalină, arginaza, ribonucleaza, se găsesc şi în microzomi şi în supernatantul de centrifugare. Legătura acestora cu granulele este însă de intensitate variabilă.

In drojdia de bere, citocromul *a* şi *b* şi peroxidaza se găsesc împreună cu succindehidraza şi citocromoxidaza în granulaţii, pe când citocromul *c*, lacticodehidrogenaza, carboxilaza, catalaza, predomină în lichidul supernatant, deci sunt mai labil legate. E de notat că, în ficat, catalaza este legată mai intim de granule.

Mitocondriile, marile granule ribonucleoproteidice, cuprind sistemele enzimatice complecte care realizează oxidarea acizilor graşi şi intervin în metabolismul aerob al glucidelor. Unele enzime, ca de exemplu esterazele şi citocromoxidazele, sunt în concentraţie mai mare în microzomi decât în mitocondri. In microzomi se găsesc deci atât enzime de oxidoreducere, cât şi enzime care intervin în sinteza proteinelor şi în procesele de fosforilare, deci tot complexul enzimatic care ar putea colabora la procesul endergonic de sinteză a proteinelor : citocromoxidaza şi succindehidraza, enzimele de bază în oxidările celulare, adenozintrifosfataza, care liberează grupările fosfat puternic energetice, dipeptidazele şi fosfatazele care s'a constatat că există oriunde are loc o sinteză a proteinelor, catepsina care se ştie că a fost folosită pentru sinteza in vitro a peptidelor.

Activitatea enzimelor în celulă este însă în funcţie de factori multipli : pH, concentraţia în diverşi ioni (deci variaţii ale presiunii osmotice), factori care modifică stabilitatea legăturilor dintre enzime şi complexul lipido-protidic celular. Prin modificarea condiţiilor exterioare şi fiziologice ale celulei se realizează modificări ale activităţii enzimatice (A. I. Oparin, N. M. Sisachian, A. M. Cobiacova), cu deplasarea echilibrului în sensul sintezei sau degradării unei substanţe. Prin modificarea reversibilă a fixării enzimelor se modifică şi activitatea lor. Acest mecanism coordonează procesele metabolice în cursul ciclului vital al celulei. In privinţa rolului nucleului şi citoplasmei în metabolismul celular, fapte experimentale arată că centrul oxidaţiilor celulare este în citoplasmă, şi nu în nucleu. Nucleul este deasemenea sărac în enzime. Fragmente anucleate îşi pot continua multă vreme metabolismul normal fără o alterare a respiraţiei, asimilaţiei, nutriţiei. Citoplasma lipsită de nucleu păstrează activitatea metabolică intactă, datorită complexului său enzimatic bogat. Sinteza proteinelor am văzut că are loc deasemenea în granulele citoplasmatice. In procesul diviziunii celulare, grupările — SH au un rol preponderent în legătură cu modificările de structură care se manifestă în timpul mitozei.

Permeabilitatea celulară

Problema permeabilităţii celulare implică problema permeabilităţii prin păturile limitante, dintre diversele sisteme heterogene, dintre celulă şi mediul extern, precum şi acelea ale diverselor sisteme intracelulare — nucleu, nucleoli, vacuole, mitocondri, microzomi, etc. Una din problemele fundamentale ale fiziologiei o constitue însă problema schimburilor care au loc între interiorul celulei şi mediul înconjurător. Studiul permeabili-

Scanned with OKEN Scanner

tăţii îşi are origina în observaţia că interiorul celulei are o altă componenţă chimică decât acest mediu, observaţie care pune dintrodată problema unei selectivităţi în pătrunderea diverselor substanţe în interiorul celulei şi din celulă în mediul înconjurător. Existenţa fenomenelor de plasmoliză, de turgescenţă, de hemoliză, indică existenţa unei selectivităţi în ceeace priveşte permeabilitatea. Intr'adevăr, dacă pătrunderea ar fi liberă, nu ar exista fenomenul de osmoză, care nu este decât un efect de compensare, şi deci nu ar exista fenomenele de plasmoliză, de turgescenţă, de hemoliză.

Existenţa unei membrane histologic diferenţiate care separă rigid celula de mediul înconjurător nu a fost constatată decât la plante. La animale şi în special la om nu s'a reuşit identificarea histologică a unei membrane separatorii a citoplasmei ; totuşi, dacă nu ar fi decât faptul că protoplasma diverselor celule nu se contopeşte una în alta, trebue să se admită existenţa unei pături limitante în jurul fiecărui celule şi chiar în interiorul celulei, între diversele sisteme. Această pătură limitantă funcţionează ca o membrană de separaţie, având însuşiri diferite de restul protoplasmei datorită tocmai poziţiei ei superficiale, poziţie care creează anumite proprietăţi caracteristice.

Pătura limitantă celulară, denumită şi membrana plasmatică sau pătura plasmatică, este selectiv permeabilă. Această permeabilitate selectivă este unul din atributele ei esenţiale. Pătura limitantă îşi pierde selectivitatea, devenind complect permeabilă, odată cu moartea celulei.

Noţiunea de permeabilitate trebue însă precizată : numai pătrunderea în interiorul celulei a unei substanţe şi nu simpla ei adsorbţie indică permeabilitatea celulei pentru acea substanţă. Metodele de studiu care să permită cu precizie pătrunderea substanţelor în interiorul celulei se împart în două grupe mari : 1) *metode directe* şi 2) *metode indirecte*.

1. **Metodele directe** sunt de mai multe tipuri : *metode optice*, bazate pe introducerea coloranţilor vitali, de dimensiune şi încărcare electrică cunoscute (semnul electric al particulelor care trebue să pătrundă în celulă fiind foarte important pentru capacitatea lor de pătrundere). Coloranţii vitali introduşi în celulă, prin capacitatea lor de a vira la modificările de pH sau de rH, pot da indicaţii asupra componentelor care au pătruns sau nu în celulă. Unele celule ştim că au chiar pigmenţi naturali care virează când în interiorul lor pătrund substanţe străine, acide sau bazice. O metodă optică directă este urmărirea precipitatelor atunci când în interiorul celulei pot pătrunde anumite substanţe care să se combine cu cea existentă în celulă ; de exemplu, celulele vegetale conţin taninuri ce se pot combina cu alcaloizii care eventual pătrund în celulă (chinina, cafeina, stricnina, etc.), formând mici precipitate. Precipitatele acestea sunt vizibile pentru diluţii de 2 milionimi de gram pentru piperidină, 1/1 000 000 pentru nicotină, 1/20 000 pentru stricnină.

2. **Metodele indirecte** sunt metode plasmolitice, metode fizico-chimice, metode chimice. In metoda plasmolizei şi hemolizei se urmăreşte variaţia de volum şi greutate a celulelor introduse în soluţii ale substanţelor respective. Metodele fizico-chimice cuprind determinarea pH-ului şi determinarea conductibilităţii.

Există şi *metode fiziologice*, bazate pe acţiunea toxică pe care o au substanţele a căror pătrundere este urmărită ; de exemplu, se ştie că potasiul este un toxic cardiac, care în anumite concentraţii provoacă o oprire a

inimii în diastolă, deci se poate urmări pătrunderea potasiului prin acest fenomen.

Trebue precizat că aşa zisa permeabilitate a păturii limitante nu este fixă, ci se adaptează la condiţiile mediului. Factorii care pot modifica permeabilitatea celulei animale pot fi factori din exteriorul şi interiorul celulei. Aceşti factori modifică permeabilitatea celulei, după cum vom vedea, prin influenţa lor asupra structurii păturii limitante însăşi.

Factorii externi pot fi temperatura, radiaţiile luminoase, razele X, radiumul. Acţiunea radiaţiilor este cu atât mai intensă cu cât lungimea de undă este mai mică. Razele X măresc permeabilitatea păturii limitante, probabil datorită unei modificări a orânduirii electronice. Curentul electric produce deasemenea o creştere a permeabilităţii. Ionii exercită o acţiune asupra permeabilităţii în raport cu poziţia pe care o ocupă în seriile Hoffmeister :

anionii : $SO_4 < Cl < Br < NO_3 < SCN < I$,

cationii : $Li ; Na < Co < Rb < K$.

Celulele animale prezintă un minim de permeabilitate în soluţiile saline echilibrate. Influenţa diverşilor ioni asupra permeabilităţii muşchiului pentru potasiu urmează seria identică cu aceea care influenţează imbibiţia muşchiului ; imbibiţia şi desimbibiţia modifică permeabilitatea păturii limitante. Permeabilitatea muşchiului pentru potasiu creşte când presiunea osmotică scade. Intre limite strânse de pH (6,1—7,6), permeabilitatea scade dacă pH-ul creşte. Toate aceste acţiuni sunt reversibile. Printre factorii externi care pot modifica permeabilitatea este şi lipsa de oxigen, care provoacă o creştere reversibilă a permeabilităţii. Substanţele farmacologice modifică şi ele permeabilitatea. Substanţele astringente ca taninul, impermeabilizează pătura limitantă celulară a eritrocitelor. Digitala scade permeabilitatea eritrocitelor pentru anioni.

Procesele de excitaţie provoacă o creştere a permeabilităţii păturii celulare limitante. In stare de narcoză, deci când se realizează experimental o scădere a excitabilităţii, se produce o scădere a permeabilităţii. Există o relaţie între modificările stării coloidale şi modificările excitabilităţii produse de narcotice.

Permeabilitatea celulei este extrem de importantă pentru întreaga ei viaţă fiziologică. Ea influenţează întregul metabolism ; astfel, pătrunderea sărurilor influenţează fenomenele enzimatice. Permeabilitatea este în funcţie de structura însăşi a păturii limitante şi aceasta, la rândul ei, poate suferi modificări reversibile sub acţiunea diverşilor factori.

Condiţiile din interiorul şi exteriorul celulei sunt acelea care au o influenţă asupra structurii păturii limitante.

Structura păturii limitante celulare

Concepţiile actuale admit la suprafaţa de separaţie între celulă şi mediul înconjurător nu o membrană izolată, independentă de protoplasma celulară, ci o pătură limitantă care face parte din însăşi protoplasma, dar care are o orientare chimică şi proprietăţi fizico-chimice diferite, din cauza poziţiei ei la limita de faze. Intr'adevăr, dacă se lezează mecanic o celulă, protoplasma se modifică astfel încât apare imediat

Scanned with OKEN Scanner

o pătură limitantă de neoformaţiune. Teoriile actuale admit că pătura limitantă este alcătuită din complexe lipido-proteice, şi că aceste complexe au aci o anumită orânduire, o anumită orientare. Pătura limitantă ar fi constituită din pături monomoleculare orientate, de structură coloidală, o structură lipido-proteică în mozaic. Pătura limitantă cea mai exterioară nu depăşeşte grosimea de 50 Å, ceeace nu poate corespunde decât unei singure pături monomoleculare proteinice sau unei singure pături monomoleculare lipidice orientate. Nu se poate însă admite existenţa unui singur tip de compuşi lipidici sau protidici. Se poate însă interpreta îmbinarea moleculelor acestor două tipuri în pătura limitantă în felul următor: la suprafaţa protoplasmei, moleculele lungi proteinice ar merge paralel cu pătura limitantă, moleculele lipoidice fiind îmbrăcate în ochiurile reţelei proteinice perpendicular pe suprafaţa celulei şi legate prin anumite legături de proteine, radicalul hidrofil al moleculei lecitinei, de exemplu (radicalul acid fosforic-colină), fiind îndreptat înspre pătura apoasă, iar radicalul hidrofob (catena acid gras-glicerol) fiind opusă acesteia (vezi figura 117 unde e=poziţia păturii proteinice, L=pătura lipoidică). Această pătură superficială va regla absorbţia sau respingerea diverselor componente.

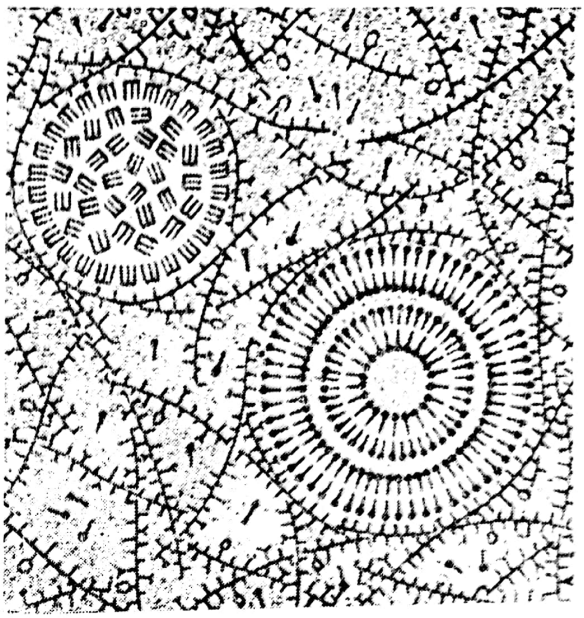


Fig. 118. Structura fină a protoplasmei

In fig. 118 este dată o schemă a acestei imagini asupra păturii limitante.

Pentru globulul roşu, pătura limitantă ar fi deasemenea formată dintr'un schelet micelar proteinic, care ar determina forma şi structura eritrocitului (fig. 119); în acest schelet ar fi înglobate lipidele. In teaca nervului ar exista orânduiri de acelaş tip, proteinic şi lipidic: în jurul cilindraxului, molecule proteinice orânduite lamelar, la care sunt fixate pături monomoleculare lipoidice. In pătura lipoidică se realizează elibe-rarea mediatorilor (acetilcolina, tiamina, histamina) (vezi fig. 123).

Catenele laterale ale păturii lipoidice intră în combinaţie cu catenele late-laterale ale păturii monomoleculare proteinice (fig. 120). Grupările rale hidrofile atrag moleculele de apă. Moleculele polare fosfatidice se pot uni cu ambele molecule Cationii (Na^+, K^+, Ca^{++}, Mg^{++}) şi anionii (Cl^-, $SO_4^=$, $PO_4^=$) intră în combinaţie cu grupele ionizate acide sau bazice din catenele laterale polipeptidice. Fiecare radical lateral din molecula proteinei va reacţiona conform caracterului său cu diversele componente cu care vine în contact, pătura limitantă condiţionând în felul acesta pătrunderea unei componente date în interiorul celulei. Când o moleculă trece din faza apoasă în pătura lipoidică, va trebui să rupă mai întâi

legături de hidrogen şi forţe Van der Waals care activează între ele şi apă. Se realizează deci un gol în pătura lipoidică. Cantitatea de energie necesară pentru a desface aceste legături poate fi foarte mare în cazul unor mul-

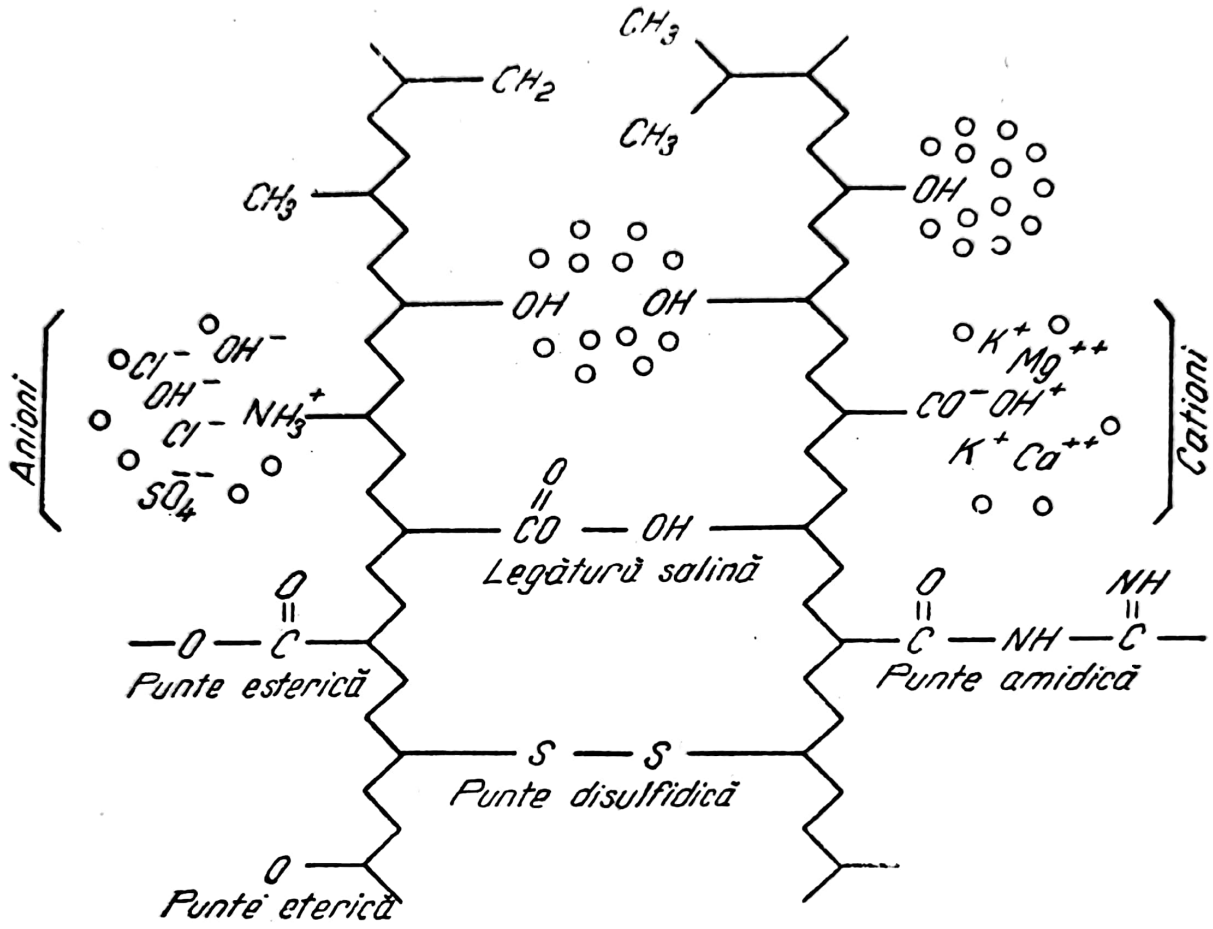


Fig. 119. Scheletul micelar proteinic al păturii limitante.

tiple legături de hidrogen. Moleculele cu grupări polare întâmpină o rezistenţă la interfaţa lipoid-apă. Moleculele mici, cu grupări polare puţine, trec uşor în pătura lipoidică. Moleculele mari polare, ca proteinele, şi cele mari nepolare de tipul colesterolului, nu pot pătrunde printr'o membrană lipoidică prin simplă difuziune; aci intervin mecanisme speciale.

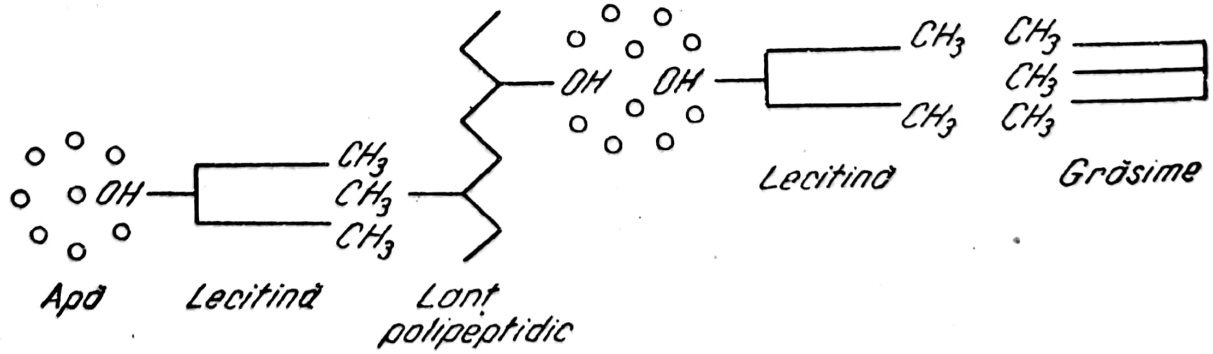


Fig. 120. Combinarea catenelor laterale din păturile monomoleculare lipoidică şi proteinică.

Trebue să amintim în legătură cu forţele care dirijează pătrunderea în celulă şi încărcarea electrică a componentelor, deci forţele electrostatice la limita de faze. Deasemenea, pătrunderea diverselor substanţe poate fi influenţată de factorii de natură enzimatică cercetaţi în ultimii ani (hialuronidaza, factorii de difuziune, etc.). In afară de membrana sau, mai exact, de pătura limitantă protoplasmatică, fiecare parte din celulă (nucleu, mitocondri, vacuole, etc.), care constitue o fază independentă, creează la limita de faze o pătură superficială limitantă care acţionează selectiv în raport cu permeabilitatea faţă de diversele substanţe.

Membrana nucleară nu a fost studiată decât foarte puţin din cauza greutăţilor tehnice. Permeabilitatea pentru apă este analoagă cu aceea a membranei plasmatice. Se ştie că este permeabilă pentru fosfaţi şi unii aminoacizi. Permeabilitatea vacuolelor, granulelor, mitocondriilor, este încă necunoscută.

Protoplasma se comportă ca o soluţie a unui gel de consistenţă semilichidă, stare specială între gel şi lichid, căreia i s'a dat denumirea de „gliode". Se admite că protoplasma ar fi un „coacervat" (se numeşte coacervat, o fază mixtă independentă care se separă de altă fază conţinând aceleaşi componente în echilibru între ele, dar în raporturi diferite; de exemplu, un amestec de apă, gelatină, gumă arabică, se separă în două faze, una constituită în special din gelatină şi gumă arabică, cealaltă din aceiaşi doi constituenţi, în cantitate mai mică însă şi conţinând o cantitate mare de apă).

După A. I. Oparin, „formarea de coacervate este una din etapele importante în evoluţia substanţei organice primordiale şi în procesul genezei spontane a vieţii" [1].

A. I. Oparin susţine că, deoarece coacervatele au o structură foarte instabilă, ele oferă posibilităţi excepţionale pentru o evoluţie ulterioară.

Protoplasma este în permanent schimb cu mediul înconjurător, în permanent echilibru dinamic cu lichidele înconjurătoare, suferind toate modificările pe care aceste lichide le suferă. In acest sens, analogia cu un concervat apare mai netă (pH, ioni diverşi, etc.). Aceste caracteristici ale protoplasmei sunt condiţionate de însuşi caracterul moleculei proteice, respectiv diversele grupuri hidrofile sau hidrofobe, polare sau nepolare, care pot stabili legături cu diversele componente.

Geneza celulei

Studiul procesului de evoluţie a substanţei vii, respectiv a celulei, este unul din domeniile cel mai puţin lămurite ale biologiei, fiind încă în faza iniţială.

Geneza celulei din „substanţa vie" este una din problemele de bază ale biologiei şi a fost urmărită în ultimii ani în institutele de cercetare din U.R.S.S. de către O. B. Lepeşinscaia.

O. B. Lepeşinscaia are marele merit de a fi urmărit studiul celulei în evoluţia ei istorică şi individuală, adică în filogenia şi ontogenia ei. Rezultatele acestor cercetări sunt extrem de interesante şi le vom expune în cele ce urmează, citând concluziile acestor cercetări relatate în mono-

[1]) *A. I. Oparin*, „Apariţia vieţii pe pământ".

grafia autoarei : „Geneza celulelor din substanţa vie şi rolul substanţei vii în organism" (O. B. Lepeşinscaia, trad. în limba română, 1952).

O. B. Lepeşinscaia studiază „evoluţia substanţei vii", activitatea ei vitală, procesele ei morfogenetice şi toate stadiile de trecere dela „substanţa vie" la celula normală, înţelegând prin „substanţa vie", „nu numai massa de substanţă lipsită de formă celulară, ci şi orice substanţă în diferite stadii de evoluţie, începând cu molecula vie, capabilă să îndeplinească metabolismul ei, prin intermediul căruia această moleculă nu se distruge, ci dimpotrivă, se conservă, evoluează, creşte şi se înmulţeşte. Substanţa vie trebue să genereze în evoluţia ei forme noi, de un ordin superior, care posedă noi caractere biologice". Pe baza datelor experimentale, O. B. Lepeşinscaia afirmă că „substanţa vie" este capabilă să evolueze şi prezintă fenomene vitale numai atunci când conţine substanţa nucleară într'o formă sau alta, adică acid ţimonucleic sau zimonucleic propriu zis, sau sub formă de nucleină sau de nucleoproteide în stare difuză sau dispersată.

Substanţa proteică sau substanţa protoplasmatică mai complexă, împreună cu substanţa nucleară, nu se amestecă cu apa, ci, venind în contact cu apa, formează sferule, care după părerea lui Oparin şi după părerea noastră reprezintă forma paracelulară primordială cea mai simplă, aşa numita moneră. Aceste monere, situate în condiţii defavorabile, pier şi sunt utilizate ca material nutritiv pentru celule, dacă se găsesc în organism, iar în condiţii favorabile de nutriţie, aeraţie şi umiditate, ele devin rezistente, capabile să îndeplinească metabolismul şi să evolueze.

In procesul evoluţiei lor putem observa formarea unor stadii de trecere, a aşa numitelor citode, protocite (Mincin), care în cursul desvoltării lor ulterioare generează celule normale tinere, capabile să se înmulţească prin înmugurire, diviziune directă sau chiar kariokineză.

Autoarea studiază geneza celulelor din „substanţa vie" în oăle de păsări, peşte, amfibii, precum şi în coacervatele izolate din celulele animalelor inferioare (hidre, englene şi parameci), folosind mijloace mecanice şi nu chimice. Problema era urmărită cu metoda culturilor de ţesuturi ; succesiunea stadiilor de transformare a substanţei vii în celule a fost urmărită în toate stadiile prin microcinematografie, obţinând clişee cinematografice ale întregii evoluţii a sferulelor protoplasmatice. Pe baza datelor experimentale, concluziile autoarei sunt următoarele, şi le citãm după textul original :

1. Celula nu este ultimul element morfologic capabil de activitate vitală (Virchow), ci *dimpotrivă, coacervatele protoplasmatice, care se găsesc în organismul în desvoltare, sau care sunt izolate din celule, dovedesc că ele sunt vii prin proprietatea lor de a genera noi celule în cursul evoluţiei lor.*

2. De aci rezultă concluzia că nu „orice celulă provine dintr'o celulă" (Virchow), că noile celule nu se formează prin diviziune, ci *celulele pot să se formeze şi din substanţa vie prin transformarea acesteia în celulă.*

3. Evoluţia substanţei vii până la celulă parcurge următoarele stadii :

a) Stadiul de formare a sferulei protoplasmatice care provine din massa de substanţă vie, amorfă. In această sferulă protoplasmatică trebue să existe şi substanţa nucleară în stare difuză sau dispersată (mitocondri).

b) Stadiul de formare, în moneră, a nucleului protoplasmatic, apoi şi a astrosferei (schimbarea gradului de dispersiune şi a aranjamentului

Scanned with OKEN Scanner

componentelor protoplasmatice), adică stadiul de restructurare intimă a protoplasmei.

c) Stadiul de formare de linină, a veziculei omogene care apoi creşte în dimensiuni.

d) Stadiul de „nucleu granular" sau „cariozom", în timpul căruia stroma de linină se împregnează cu granulaţii nucleare colorabile cu coloranţi bazici.

e) Stadiul de „celulă tânără" sau „celulă sferulă", cu un nucleu mare, cu o protoplasmă ce conţine granulaţii bazofile şi cu un nucleol care se colorează cu coloranţi bazici.

O. B. Lepeşinscaia constată toate aceste stadii în procesul evoluţiei sferulelor viteline, deci în *fracţiunea vegetativă anucleată a oălor*; *în procesul de creştere intensă a ovocitului, până în momentul fecundării lui*, în procesul *diviziunii kariokinetice* a celulelor animale.

Pe baza acestor observaţii autoarea afirmă că „*orice celulă nu provine din celulă, ci din protoplasmă*, şi această interpretare include geneza celulelor din substanţa vie sau din sferulele viteline, precum şi formarea celulelor prin diviziunea altor celule, şi că deci „nu numai organismele întregi, organe şi ţesuturi se pot regenera, ci şi celulele. Ele sunt capabile să regenereze din substanţa vie pusă în libertate prin distrugerea mecanică a celulelor, în care caz celula încetează să existe ca atare, dar protoplasma ei, situată în condiţii favorabile, se conservă ca substanţă vie şi, evoluând, poate să se transforme în celulă".

Concluziile fundamentale ale acestor cercetări sunt: „1) celulele se pot forma nu numai din celule, ci şi din substanţa vie; 2) insulele sanguine, vasele sanguine şi elementele figurate ale sângelui se formează din sferulele viteline care se găsesc în foiţele embrionare". Pe baza rezultatelor obţinute, autoarea stabileşte că „celulele îşi au istoricul lor, filogenia şi ontogenia lor. Prin urmare şi cromozomii, ca organite celulare, trebue studiaţi din punctul de vedere al evoluţiei lor, deci pe planul filogeniei şi ontogeniei lor. Studiind transmiterea caracterelor ereditare trebue să luăm în considerare nu numai rolul cromozomilor, ci şi rolul substanţei vii a celulei întregi".

„Caracterele ereditare nu sunt transmise de către cromozomi, ci de către toată celula, de substanţa vie, de structura şi de particularităţile ei chimico-biologice. Desigur, în transmiterea caracterelor ereditare, rolul principal, rolul cel mai important îl joacă organismul, care se găseşte în interrelaţie cu mediul înconjurător".

ŢESUTURILE

ŢESUTUL EPITELIAL

Ţesutul epitelial este constituit în special din keratine, proteine caracterizate prin rezistenţa lor mare faţă de acţiunea agenţilor chimici şi enzimatici. Această rezistenţă am văzut că îşi găseşte explicaţia în structura chimică a acestei componente. Molecula keratinei este formată din catene polipeptice ale moleculelor de cistină ce intră în mare cantitate în compoziţia ei. Părul uman este foarte bogat în cistină (9—17%). Părul, unghiile, epidermul sunt constituite din keratine. Există mai multe tipuri

Scanned with OKEN Scanner

de keratine, în raport cu structura lor moleculară. Keratinele nu sunt degradate de enzimele sucului gastric şi pancreatic; sunt digerate de o enzimă din intestinul moliei.

ŢESUTUL CONJUNCTIV

1. **Ţesutul fibros** conţine ca principal constituent colagenul care, ca şi keratina, este rezistent la acţiunea agenţilor chimici. Conţine mai puţin S decât keratina, conţine glicocol în mare cantitate, apoi prolină şi oxiprolină. Este slab digerat de pepsină, dar nu este atacat de tripsină. Prin fierbere cu apă, colagenul este transformat în gelatină.

2. **Cartilajele.** Constituentul principal al cartilajelor este condromucoidul, care are drept grupare prostetică acidul condroitinsulfuric (am descris la capitolul respectiv structura acestei componente).

Condromucoidele diverselor ţesuturi diferă prin componenta lor proteică.

Acidul hialuronic (enunţat la capitolul Mucopolizaharidelor) este o componentă a ţesutului conjunctiv, care intră în structura substanţei fundamentale. Are proprietatea de a forma un gel, servind ca substanţă de cimentare care menţine unite între ele celulele şi fixează apa în interstiţiile ţesutului. Structura lui este aceea a unui polimer înalt, cu molecula puternic polimerizată, care, sub acţiunea unei enzime, hialuronidaza, este depolimerizată. Enzima se găseşte în celulele spermatice, veninul şerpilor, al albinelor, la unele bacterii. Importanţa biologică a hialuronidazelor este aceea de permeabilizare a ţesuturilor (de exemplu, lichefiază gelul vîscos care înconjoară ovulul, permiţând pătrunderea spermatozoidului). Hialuronidaza, prin acţiunea de depolimerizare a lichidului sinovial, micşorează vîscozitatea acestuia. Asociată cu substanţe administrate în injecţii subcutanate, favorizează difuziunea şi absorbţia acestora în ţesuturi (prin scăderea vîscozităţii massei gelatinoase din spaţiile interstiţiale), astfel că reduce tumefacţia şi durerile locale.

ŢESUTUL ADIPOS

Ţesutul adipos este format din vezicule adipoase, celule diferenţiate din ţesutul conjunctiv.

Conţine 30% apă, 70% reziduu uscat, protide 2—5% din reziduul total, grăsimi 80—95%, fosfatide 2—5%. Grăsimile neutre conţin pigmenţi liposolubili (lipocromii).

Compoziţia grăsimilor neutre variază cu o serie de factori exteriori — temperatura, alimentaţia, etc. Variază deasemenea cu vârsta, astfel: la copii oleidele sunt în proporţie de 67,7%, la adult 69,8%, palmitidele 29,8% la copii şi 28,1% la adult, steroidele 33% la copii şi 20% la adult.

Tabelul 28

Compoziţia grăsimilor la om

Nesaponificabile	0,37%	Acid linoleic	0,5%
Colesterol	0,24%	„ miristic	1%
Acizi graşi totali	94,6%	„ lauric	urme
„ „ nesaturaţi	63,6%	Acizi cu 3 duble legături	0,03
„ „ saturaţi	26,6%	Acizi cu 4 duble legături	0,33

Scanned with OKEN Scanner

ŢESUTUL OSOS

Osul uscat şi degresat conţine între 30—50% substanţe organice, iar restul este constituit de substanţe minerale (în medie 40% substanţe organice, 60% substanţe minerale). Conţinutul în apă al osului variază între 14—44%, în funcţie de tip şi localizare în organism; la fel, conţinutul în lipide. Pentru un acelaş os, însă, aceste componente au valori constante.

Componenta organică a osului conţine colagen, oseoalbumine, oseomucoide şi lipide. Ar conţine şi urme de acid citric, componentă care ar putea avea un rol important în mobilizarea calciului. Componenta minerală a osului este formată în special din Ca, fosfaţi şi carbonaţi şi mici cantităţi de Mg, Fe şi sulfaţi. Scheletul constitue un rezervor de substanţe minerale, care intervin în special în ciclul metabolic al Ca şi P.

Aceste substanţe s'ar găsi aproximativ în următoarele proporţii: 85% $Ca_3 (PO_4)_2$, 10% $CaCO_3$, 1,5% $(PO_4)_2$ Mg. urme de Cl, Na, K, Fl, Fe, Al. Raportul fosfat/carbonat = 9,11.

Compoziţia minerală a osului variază însă în cursul vieţii şi în special în cursul osificării.

Ultimele cercetări chimice, confirmate de studiul cu raze X, au dus la concluzia că substanţa minerală osoasă se prezintă ca un amestec fizic de fosfat tricalcic $(PO_4)_2$ Ca_3 şi carbonat de calciu, CO_3Ca, împreună cu alte săruri în cantităţi mici şi nu sub formă de apatite, cum s'a crezut multă vreme. Calcinarea la 900° în atmosferă de CO_2 sub presiune redusă transformă acest amestec în apatite.

Compoziţia minerală a osului variază mult cu vârsta, datorită osificării cartilajelor la indivizii în creştere; chiar la adult există mutaţii fiziologice ale componentelor în special în cursul osificării.

S'a dovedit că există în oase un metabolism foarte activ. Substanţele minerale din oase se pot regăsi în alte ţesuturi în cazuri speciale ca, de exemplu, în formarea laptelui la animalele în lactaţie, în formarea oaselor la făt în timpul gestaţiei.

Studii cu ^{32}P radioactiv au arătat că, la scurt interval după ingerarea sau introducerea pe cale sanguină, are loc o fixare a acestuia în oase, ceeace indică un schimb metabolic între P din oase şi P din plasmă sau limfă. După câtva timp, ^{32}P radioactiv dispare din oase şi se poate regăsi în dentina din dinţi, deci fosforul suferă o continuă reînnoire — o continuă migraţie.

Chimismul osificării

Fenomenul osificării este un proces complex sub dependenţă hormonală, a vitaminelor şi a fosfatazelor. In mod schematic, în procesul de osificare intervin următoarele etape mari:

1. producerea matricei proteice (componenta proteică a substanţei interfibrilare, cunoscută sub numele de substanţă preosoasă) impregnată cu calciu, fenomen care e sub dependenţa vitaminei C;
2. intervenţia fosfatazelor care provoacă acumularea de ioni PO_4^{---} în această matrice;
3. remanierea acestei substanţe proteice, astfel încât să ducă la o bruscă eliberare a Ca^{++};

4. unirea ionilor PO_4^{---} cu ionii Ca^{++} cu formarea fosfatului tricalcic $(PO_4)_2\ Ca_3$ care, fiind foarte puţin solubil, precipită pe matricea organică a osului, realizând astfel calcificarea. Acesta din urmă este un proces pur fizico-chimic. Nu se ştie cu precizie care este combinaţia între componenta organică şi cea minerală a osului.

Rolul fosfatazelor în fenomenul osificării este foarte important, deoarece contribue la aportul continuu de ioni PO_4^{---} la nivelul substanţei osoase. Ele scindează gruparea PO_4^{---} din esterii fosforici din sânge (hexozofosfaţi, glicerofosfaţi, etc.), esteri rezultaţi din fosforoliza glicogenului, aşa cum am văzut la capitolul respectiv. Fosforilazele pun deci la îndemâna fosfatazelor substratul necesar. Gruparea PO_4^{---} eliberată va reacţiona cu calciul şi se va depozita în oase sub formă de fosfat de calciu. Esterii fosforici, deşi există în sânge în cantităţi extrem de mici (0,2—0,5 mg P%), constitue totuşi o rezervă importantă datorită intervenţiei continue a fosfatazelor. In afecţiuni osoase se constată, într'adevăr, modificări ale conţinutului în fosfatază ; astfel, în osteita deformantă se constată creşterea fosfatazei sanguine, la fel în rahitism.

In fenomenul osificării intervin însă şi o serie de vitamine şi hormoni.

Vitamina D ar influenţa absorbţia calciului de către mucoasa intestinală. In special în cazul unei alimentaţii rahitogene, vitamina D influenţează restabilirea raportului Ca/P, astfel ca să se realizeze nivelul necesar calcificării. Raportul trebue să fie mai mic decât 2 ; când raportul Ca/P din alimentaţie este mai mare decât 2, apar leziuni la nivelul zonelor pe cale de osificare.

Vitamina A ar influenţa structura osului în creştere, limitând multiplicarea osteoblastelor şi osteoclastelor. *Rolul vitaminei C* ar fi acela de a permite producerea matricei proteice impregnate cu fosfataze în care se depun sărurile. Vitamina C ar stabiliza fosfataza alcalină. *Hormonul paratiroidian* intervine în metabolismul calciului şi deci al P, reglează pragul de eliminare renală a P. Primul efect al paratiroidectomiei este provocarea unei retenţii renale de P, coborîrea calcemiei şi calciuriei. Injecţiile de hormon paratiroidian măresc excreţia renală a P. *Hormonul tiroidian* are acţiune asupra creşterii oaselor.

BIOCHIMIA DINŢILOR

Dintele, ca orice componentă a organismului, are o structură complexă ; componentele diferă între ele atât histologic, cât şi chimic. Părţile mari din care este compus dintele sunt : emailul, dentina, cimentul şi pulpa, fiecare având proprietăţi caracteristice.

Pulpa este ţesutul moale necalcificat. Ca şi ţesutul periodontic (care înconjoară dintele), pulpa dintelui e supusă tuturor variaţiilor şi influenţelor la care sunt supuse ţesuturile moi ale organismului.

Emailul, dentina şi cimentul sunt analoage ţesutului osos, dar au şi multe proprietăţi diferite. Trebue precizat că există multe variaţii individuale ale dinţilor.

Cercetările asupra naturii chimice a dentinei şi emailului sunt numeroase.

Emailul e substanţa cea mai dură din corp, ar conţine 36% Ca ; 17% P ; 0,4% Mg ; 2,5% CO_2. Are o duritate considerabilă datorită proporţiei mari de minerale (85%) şi conţinutului cel mai mic în apă.

Dentina ar conține 27% Ca; 13% P; 0,8% Mg; 3% CO_2. Mai conține în cantități foarte mici și alte elemente.

Cimentul, care înconjoară rădăcina, are structura țesutului osos; 30% este substanță organică.

Pulpa dentară conține 3,84% cenușă, 90% apă. Intră în componența ei proteine, grăsimi neutre, fosfatide, acizi grași (oleic, palmitic, lauric și miristic) și o serie de enzime (fosfataze, amilază, lipază, zaharază, catalază).

Partea minerală a dintelui

Studiul cu raze X indică pentru dentină și email o structură analoagă cu a oaselor; sunt constituite în special din hidroxiapatită, *cu puțină fluoroapatită* (apatitele sunt combinații de fosfat de Ca și carbonat de Ca).

Emailul ar conține 60% apatită, 30% fosfat tricalcic, 1% carbonat de Ca, 9% substanțe organice, plus alți constituenți minerali, Cl, Fl, Mg, CO_2, Na.

Dentina și cimentul, ca și oasele, conțin în special fosfat tricalcic.

Studiul diverselor minerale care se găsesc în structura dintelui a dus la următoarele concluzii:

Studiul cu ajutorul izotopilor a arătat că sodiul e adsorbit la suprafața emailului și dentinei.

Potasiul, litiul, stronțiul se găsesc în cantități foarte mici, zincul în cantități mai mari decât în alte organe (în cariile dentare ar avea loc o creștere a zincului). Fierul se găsește în cantități mici și nu se crede că ar avea vreo funcție specifică. Cuprul în urme; clorul deasemenea. Fluorul în cantități variabile; dinții animalelor care trăiesc în apa mării, care conține Fl, au un conținut mai mare în Fl. S'au găsit și urme de elemente rare: uraniu (de exemplu în dinții pisicii), Al, Be, Si, Ag, titan, vanadiu; plumbul poate fi adsorbit în intoxicațiile cu plumb.

După *Ca* și P, un element mai important este Mg.

Natura substanței organice a dintelui

Substanța organică (care constitue în email 5%, în dentină 40%) este în majoritate compusă din proteine; au fost separate trei fracțiuni: glutina, colagenul și keratina. Proteina predominantă în dentină ar fi colagenul; cea din email este de natura keratinelor. Prin cromatografie s'a studiat compoziția în aminoacizi. S'au găsit în compoziția dentinei acid aspartic, acid glutamic, serină, glicocol, valină, alanină, hidroxiprolină, metionină, izoleucină, leucină, fenilalanină, triptofan, treonină, arginină, lizină, histidină. Compoziția dentinei e variabilă, în sensul că ar conține acid aspartic și glutamic liber, în cantități mai mari în raport cu ceilalți aminoacizi. Experiențe cu soluții ale acestor acizi ar arăta chiar o acțiune de decalcificare a acestora.

Calcificarea dinților nu este uniformă, de exemplu emailul este mai calcificat în pătura cea mai exterioară. Există o gradare a calcificării, care scade pe măsură ce se apropie de joncțiunea dentină/email. Deficiența de Ca în alimentație influențează direct procesul de calcificare, atât în email, cât și în dentină. E important în special raportul Ca/P. Deasemenea, deficiența de Mg produce modificări în depozitarea emailului, în formarea dentinei, determină depozitarea de concrețiuni în pulpa dentară. Fluorul ar avea un rol foarte important în calcificarea țesuturilor,

Scanned with OKEN Scanner

prin acţiunea pe care o are asupra fosfatazelor (are rol de inhibitor al fosfatazelor).

In general, proprietăţile fizice şi fiziologice ale dinţilor sunt mult influenţate de cantitatea de fluor cu care au venit în contact în timpul vieţii.

Mecanismul calcificării dinţilor ar fi analog cu acela al oaselor. Atât în email, cât şi în dentină, are loc o precipitare a fosfatului de calciu din lichidele înconjurătoare. Ţesutul tare al dinţilor începe să se formeze la joncţiunea dentină/email cu formarea emailului din ţesuturile epiteliale şi a dentinei din ţesuturile mezenchimatoase.

Solubilizarea dintelui este în funcţie de pH; e mare sub pH aproximativ 5, e slabă peste pH = 6; poate fi mult scăzută prin adăugare de ioni Ca, fosfat şi prin administrare de fluor. Copiii care primesc un supliment de fluor în alimentaţie au dinţii extrem de bogaţi în fluor şi mai rezistenţi, deaceea ingestia de fluor trebue realizată dela cea mai fragedă copilărie.

Acţiunea vitaminelor

S'a observat că administrarea corectă de vitamine face dinţii mai rezistenţi împotriva cariilor.

Deficienţa vitaminei A din alimentaţie determină o serie de modificări în formarea emailului şi a dentinei. Prezenţa vitaminei A este esenţială în procesul de formare a dinţilor.

Vitaminele B ar avea acţiune în special în formarea ţesuturilor moi.

Vitamina C controlează formarea şi funcţia ţesutului mezenchimatos, formarea dentinei. Modificări patologice în ţesutul gingival ar fi datorite deficienţei în vitamina C.

Efectul deficienţei în vitamina D se exercită asupra metabolismului Ca/P. Excesul de vitamină D produce deasemenea turburări caracterizate prin suprafeţe de calcificare anormale în regiuni unde în general procesul nu se produce. Vitaminele A,C şi D sunt importante pentru desvoltarea dinţilor; aportul exterior al acestora este indispensabil.

Acţiunea hormonilor

Parathormonul intervine în desvoltarea dintelui datorită acţiunii lui asupra Ca sanguin, necesar calcificării.

Hormonul tiroidian influenţează viteza de desvoltare şi erupţia dinţilor.

Hormonii medulari şi corticali intervin în metabolismul calciului Paratiroida are acţiunea cea mai netă.

Cariile dentare

Dacă pH-ul soluţiilor înconjurătoare scade sub pH < 5, are loc o disolvare destul de intensă a materiei dintelui. Se pune deci problema în ce condiţii se realizează în cursul vieţii acest pH. Este sigur că alimentele glucidice au un rol capital în formarea cariilor, deoarece sunt descompuse sub acţiunea florei bacteriene din cavitatea bucală şi în special de *Lactobacillus acidophilus*, care se găseşte obişnuit în gură; el realizează această descompunere şi e capabil să trăiască la acest pH.

Produsele de fermentaţie a zaharurilor sub influenţa acestui germen sunt acizi care coboară pH-ul şi astfel provoacă solubilizarea sărurilor de calciu. Saliva are o anumită acţiune de apărare a dinţilor; s'a constatat că gradul mare de aciditate nu e realizat în timpul zilei, ci în timpul repausului nocturn, când are loc o scădere a secreţiei de salivă. O protecţie eficace o realizează benzoatul de sodiu sub formă de comprimate pentru a fi masticate şi spălarea prealabilă a dinţilor.

După unii autori, bacteriile proteolitice care duc la formare de aminoacizi liberi ar avea şi ele un rol, dar infinit mai mic. S'a constatat că dinţii cariaţi conţin mai puţin fluor decât cei intacţi şi că mici cantităţi de fluor în apele de gură reduc în anumită măsură formarea cariilor. Acest element intră chiar în formarea apatitelor dentare. Se poate însă ca acţiunea Fl să se exercite chiar asupra fosfatazelor care intervin în fenomenul calcificării prin acţiunea pe care o au asupra degradării glucidelor în acid lactic. Deasemenea, acidul monoiodacetic, care e inhibitor al acestor enzime, realizează o reducere a cariilor.

ŢESUTUL MUSCULAR

Ţesutul muscular constitue 40% din greutatea corporală. Din punct de vedere fiziologic se împarte în:

1. muşchiul striat voluntar al sistemului scheletic,
2. muşchiul neted (involuntar) al sistemului visceral,
3. muşchiul cardiac.

STRUCTURA BIOCHIMICĂ A MUŞCHIULUI

Ţesutul muscular este format dintr'un mare număr de celule alungite, constituind fibrele musculare. Fibrele musculare pot atinge lungimi între 1 mm — 4 cm, după natura muşchiului. Diametrul fibrelor poate varia între 10—100 μ. Observate la microscop, se vede că fibrele muşchiului striat sunt formate dintr'un mare număr de elemente diferenţiate, miofibrilele, înconjurate de o substanţă de structură analoagă unui gel, sarcoplasma (corespondenta citoplasmei celorlalte celule).

Miofibrilele au forma unui fus cu un diametru de 1—2 μ şi sunt orânduite paralel cu axa fibrei.

Privite la microscop, fibrilele prezintă striaţii transversale cu aspect alternativ întunecat şi luminos.

Proprietăţile optice diferite ale acestor porţiuni alternante sunt datorite izotropiei porţiunilor luminoase şi anizotropiei porţiunilor întunecate. In lumină polarizată, aspectul acestor striuri este inversat. Striaţiile ar fi datorite fie unor variaţii în concentraţia substanţei proteinice din care este constituită fibrila, fie unei orânduiri diferite, de tip periodic, a proteinei. Striaţiile întunecate, respectiv benzile anizotrope, prezintă dubla refracţie şi, când muşchiul se contractă, numai acestea suferă o scurtare. Benzile izotrope, luminoase, nu prezintă dubla refracţie şi nu se scurtează în timpul contracţiei.

Ţesutul muscular conţine 75—80% apă, restul este constituit din substanţe organice şi minerale.

Scanned with OKEN Scanner

Substanţele minerale

Electrolitul cel mai important pe care îl conţine muşchiul este K^+. Conţine Ca^{++}, Mg^{++}, Na^+, P^{+++}, Cl^-, S^{--}. Conţinutul în mg la 100 g ţesut este redat în tabelul 29.

Excitabilitatea şi contractilitatea muşchiului sunt în funcţie de prezenţa ionilor de K^+. Ionul Mg^{++} este necesar activităţii unor enzime. Fosforul se găseşte sub forma de fosfaţi minerali şi esteri fosforici.

Tabelul 29

	mg %
K	320—400
Ca	8
Na	80
Mg	21
Cl	70
Sulfaţi	urme

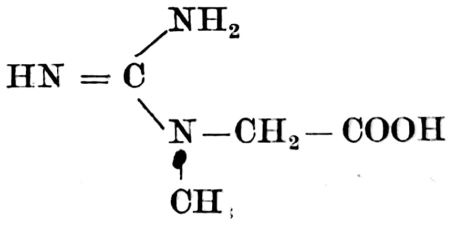
Substanţele organice

Sunt reprezentate de o serie de componente glucidice, lipidice, componente azotate neproteice (cunoscute sub numele de compuşi azotaţi extractivi) şi componente azotate proteice, cum şi de o serie de vitamine şi de enzime.

Glicogenul, glucidul cel mai important din muşchi variază între 0,2—8%, valoare care e mult redusă în urma unei activităţi musculare intense. Alte glucide prezente în muşchi sunt glucoza: 0,02—0,04%; esteri hexozofosforici: glucozo - 6 - fosfat şi fructozo - 6 - fosfat, care apar în cursul glicogenolizei. Conţine acid lactic l (+), inozitol ($C_6H_{12}O_6$), a cărei funcţie în acest ţesut nu se cunoaşte.

Lipidele musculare totale reprezintă 0,5—1,5%, fosfolipidele 1%, colesterolul 0,013—0,040%, grăsimile neutre 0,8—3,7%.

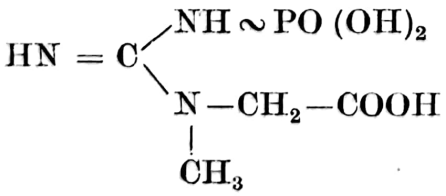
Compuşii azotaţi neproteici sunt: creatina, fosfocreatina, creatinina, bazele purinice (xantina, hipoxantina), acidul uric, ureea, acidul adenilic, acidul inozinic, acidul adenozintrifosforic, anserina, carnozina, carnitina.



Creatina

Creatina (acidul metilguanidinacetic) se găseşte în muşchiul striat, în muşchiul cardiac. Organismul adult uman conţine aproximativ 120 g creatină, din care: 98 % în ţesutul muscular, 1,5 % în ţesutul nervos, 0,5 % în celelalte ţesuturi.

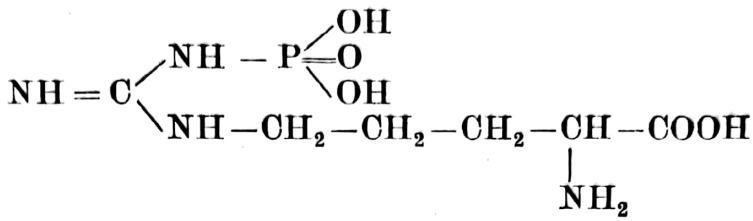
In muşchi se găseşte în cea mai mare parte sub formă de fosfocreatină (fosfagen, acid creatinfosforic 80%).



Fosfocreatina

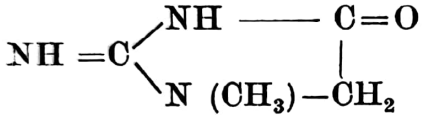
Radicalul fosforic din molecula fosfagenului este legat de gruparea — NH_2 a creatinei, formând o legătură puternic energetică (~) analoagă grupărilor fosfat terminale din acidul adenozintrifosforic şi adenozindifosforic. Prin natura acestei legături, fosfocreatina constitue un factor integrant în activitatea muşchiului, în ciclul metabolismului glucidelor — unde serveşte ca donator şi acceptor de grupare fosfat —, după cum vom vedea la capitolul chimismului contracţiei musculare. Am văzut că poate fi sintetizată din glicocol şi arginină, metionina servind ca agent de metilare.

In mușchiul nevertebratelor, fosfocreatina este înlocuită de **fosfoarginină**:



Creatinina, anhidrida internă a creatinei, se găsește în mușchi în cantitate mult mai mică. In sângele total se găsește creatinină în cantitate de 2,5 mg% (pe când creatina = 3,5—5 mg) și este repartizată egal între globul și plasmă, în timp ce creatina se găsește în cantitate mai mare în globulul roșu. Origina creatininei este creatina, dar origina creatinei nu se cunoaște încă.

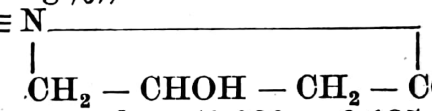
Creatinina este un produs de eliminare și excreția de creatinină poate fi luată drept indice al metabolismului muscular:



Creatina și creatinina se găsesc în cantitate variabilă (0,27 — 0,60 g%) (țesut proaspăt).

Bazele purinice din mușchi sunt adenina, guanina, xantina și hipoxantina.

Carnozina, dipeptidul β-alanilhistidina, se găsește în cantitate destul de importantă în mușchi (0,23—0,32 g%), deasemenea *anserina*.

Carnitina, o betaină,  este în cantitate mică în țesutul muscular (0,020 — 0,125 g%).

Tabelul 30

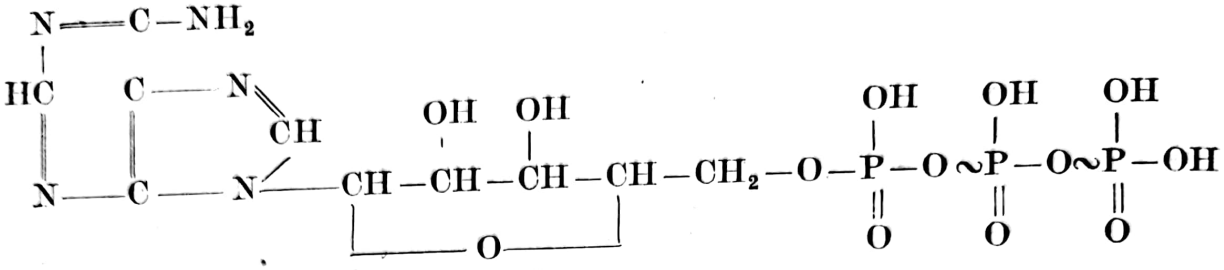
Compoziția mușchiului proaspăt

(valori exprimate în g la 100 g de țesut proaspăt)

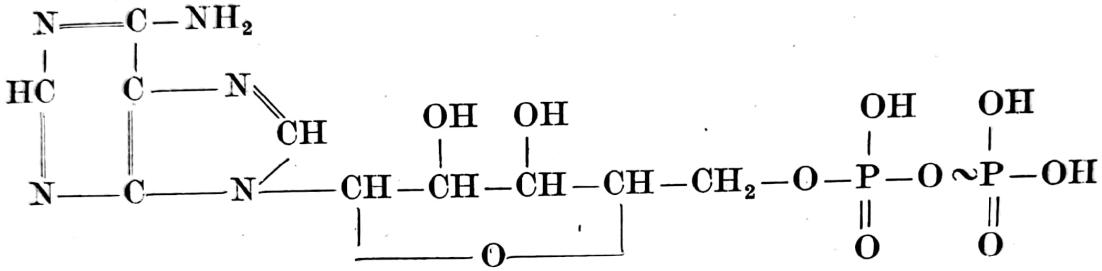
Apă	72—80
Reziduu sec	20—28
Cenușă	1—1,2
Protide	16,5—21
Creatină și creatinină	0,27—0,60
Fosfagen	0,06—0,08 (mușchi roșu)
	0,100—0,140 (mușchi alb)
Metilguanidină	0,010—0,040
Derivați purinici	0,023—0,070
Carnozină	0,23 —0,32
Carnitină	0,020—0,125
Uree	0,05 —0,15
Acizi aminați și peptide	0,10 —0,70
Glutation	0,030—0,040
Acizi organici	0,020—0,050
Glicogen	urme —9,00
Inozitol	0,010 (mușchiul scheletic)
	0,10 —0,37 (mușchiul cardiac)
Acid lactic	urme —1,5
Lipide	0,8 — 3,7 grăsimi neutre
	0,4 —1,0 fosfatide
	0,013—0,040 colesterol

Scanned with OKEN Scanner

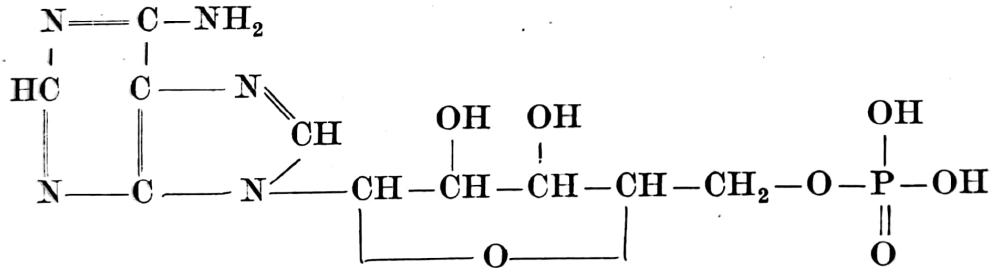
In muşchi există compuşi adenilici, compuşi extrem de importanţi: acidul adenozintrifosforic (ATF), adenozindifosforic (ADF), acidul adenilic (AA), şi acidul inozinic. Baza purinică este adenina în primii trei şi hipoxantina în acidul inozinic (prin desaminarea adeninei).



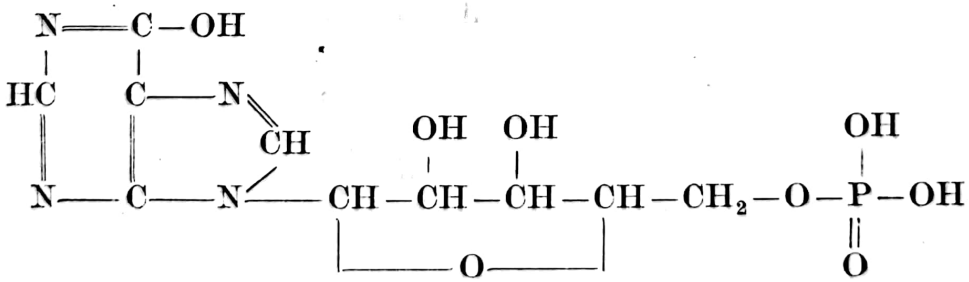
acidul adenozintrifosforic (ATF)



acid adenozindifosforic (ADF)



acid adenilic (AA)



acid inozinic

Legătura fosfat în acidul adenilic şi inozinic este o legătură normală care eliberează 3 000 calorii pe mol fosfat eliberat, pe când celelalte legături, fosfat adiţionale în acidul adenozintrifosforic şi difosforic sunt legături puternic energetice (∼), care, prin desfacere, eliberează 10 000—12 000 calorii pe mol fosfat eliberat, legături care vom vedea că au rol funda-

mental în energetica contracției musculare. Acidul adenilic nu există liber în mușchi, deoarece, fiind toxic, este repede desaminat la acid inozinic, sub acțiunea unei desaminaze.

O componentă a mușchiului, de importanță funcțională excepțională, este *acetilcolina* care se știe că are un rol de bază în transmiterea excitației nervoase.

Proteinele musculare. Proteinele musculare se pot extrage cu soluții saline diluate (ClNa 6%). In această extracție se pot distinge, după fracționare, o serie de proteine: miozina, globulina X, miogenul, mioglobulina, stroma (musculară).

Miozina reprezintă 39—57% din proteinele totale; globulina X 18—27%; miogenul 9—22%; stroma 16—27%; mioglobina 1%.

Globulina X este globulina sarcoplasmei. Nu se știe cu precizie ce funcție îndeplinește. Are o greutate moleculară de 160 000. Coagulează la 50°.

Miogenul are caracterul unei albumine. Există în sarcoplasmă. Are o greutate moleculară de 80 000—100 000. S'au separat două fracțiuni, miogenul A și B, cristalizate. Miogenul A ar avea greutatea moleculară 150 000 și ar avea activitatea enzimatică a unei aldolaze.

Mioglobina este hemoglobina din țesutul muscular. Are capacitatea de a fixa și de a ceda cu ușurință oxigenul. Citocromii există în special în mușchiul cardiac.

Stroma nu este extractibilă cu soluțiile saline obișnuite. Conține o proteină, *actina*, care, împreună cu miozina, formează actomiozina.

Sarcoplasma este formată din proteinele globulina X, miogenul, mioglobina și nucleoproteide.

Miozina sau, mai corect, miozinele, deoarece cercetările ulterioare au arătat că există mai multe miozine, constitue sistemul proteinic cantitativ și funcțional cel mai important din țesutul muscular. Reprezintă aproximativ 60% din proteinele totale. Este proteina componentă a fibrilelor musculare, a elementelor contractile din mușchi, a miofibrilelor.

Se credea înainte că structura edificiului contractil muscular este formată dintr'o singură miozină; cercetări ulterioare (inițiate în 1942) au arătat că acest edificiu contractil este constituit dintr'un complex proteinic labil, care suferă modificări în cursul travaliului fiziologic. S'au izolat astfel o serie de miozine diferite după modul de extracție și caracterele lor fizico-chimice, pe care le vom descrie, deoarece intervenția lor în procesul activității musculare este importantă.

Miozina Weber—Edsall se obține din țesutul muscular prin extracția la 4° cu 1—15 volume ClK 0,5 M și 0,03 M CO_3HNa — agitare 2 ore, separarea pulpei musculare, diluare de 5—10 ori. In aceste condiții, precipită o miozină care reprezintă 40% din proteina musculară. Este o euglobulină cu pHi=5,4. Dă soluții opalescente, puternic vîscoase, care prezintă fenomenul birefringenței de orientare. Astfel, soluțiile devin birefringente prin agitare, prin trecere prin orificii fine capilare, prin alunecare între pereți apropiați și în special ori de câte ori sunt supuse unei acțiuni mecanice care duce la o orientare a miceliilor pe anumite direcții. Birefringența acestor soluții de miozină este, în parte, datorită diferenței dintre indicele de refracție al miceliilor și al mediului de dispersie (anizotropie relativă) și, în parte, unei orientări dirijate a miceliilor filiforme (anizotropie absolută). Aceste două tipuri de anizotropii au fost

Scanned with OKEN Scanner

constatate la muşchiul „in vivo" şi sunt localizate în regiunea contractilă a miofibrilelor muşchiului striat.

Birefringenţa şi contractilitatea sunt totdeauna corelate funcţional şi s'a constatat că apariţia de contractilitate şi birefringenţă sunt corelate în timpul ontogenezei.

S'a dovedit existenţa în proteinele contractile a unor structuri orientate pe anumite direcţii şi cu ajutorul microscopului electronic.

Miozina extrasă după tehnica descrisă poate fi transformată în fire prin injectarea soluţiilor ei în mari cantităţi de apă cu ajutorul unor capilare. Firele astfel obţinute au unele caractere comune cu fracţiunile anizotrope din fibrilele musculare, prezintă un spectru cu raze X analog cu acela din muşchi, au proprietăţi plasto-elastice şi visco-elastice analoage

Tabelul 31

Compoziţia în aminoacizi a miozinei

Valori exprimate în procente (material uscat)

Arginină	7,0 %	Metionină	3,40
Histidină	1,70 %	Glicocol	1,90
Lizină	10,30	Alanină	6,50
Tirozină	3,40	Leucine	11,0—15,60
Cistină	1,40	Valină	2,60
Acid glutamic	22,10	Prolină	0,50
Acid aspartic	8,90	Fenilalanină	4,30
Serină	3,90	Triptofan	0,80
Treonină	4,95		

cu ale muşchiului. Această miozină are o greutate moleculară de aproximativ 1 000 000, grosimea de 60 Å, lungimea de 10 000 Å, N : 15,3 %, N amidic : 1,19 %, conţine lipide.

Prin denaturare pierde birefringenţa de orientare, scade vîscozitatea, scade solubilitatea, creşte numărul grupărilor —SH libere.

Miozina astfel extrasă ar fi formată din două componente, şi anume : miozina propriu zisă şi actomiozina.

Miozina propriu zisă (Szent-Györgyi) este obţinută sub formă de cristale după îndepărtarea actomiozinei. Soluţiile sale prezintă birefringenţă de orientare, care dispare după adăugare de ClK. Conţine lipide 3 %, S = 1,14 %, N = 16,15 %.

Actomiozina (Szent-Györgyi) se obţine după extracţia pulpei musculare şi îndepărtarea ATF prin hidroliză. Este o combinare a miozinei cu actina, o proteină din stroma musculară.

Actomiozina se poate prepara prin amestecarea soluţiilor de miozină cu soluţii de actină. Actomiozina nu are o structură bine definită ; proporţia de miozină şi actină diferă după durata de extracţie : prin extracţii de scurtă durată se obţine miozina A, prin extracţii de lungă durată, miozina B. Miozina B este o actomiozină care conţine 5 mg miozină la 1 g actină.

Soluţiile de actomiozină (în ClK, 0,4 M) sunt puternic vîscoase, au o mare birefringenţă de orientare, independentă de pH şi de concentraţie salină, ceeace ar indica o asimetrie constitutivă a particulelor în soluţie.

Scanned with OKEN Scanner

Actina, izolată de Straub, este o proteină a stromei musculare; poate exista sub două forme, una globulară şi una fibrilară. Proteina globulară, „G-actina", are în soluţie o vîscozitate slabă, nu prezintă birefringenţa de scurgere. Proteina fibroasă, „F-actina", este o proteină fibrilară.

In soluţii saline ionizate are o structură fibroasă, puternic vîscoasă, prezintă birefringenţă de scurgere. G-actina poate fi transformată în F-actină sub influenţa ionilor K^+ şi Mg^{++} printr'un proces de polimerizare; această transformare a G-actinei în F-actină poartă numele de „activare" (Szent-Györgyi).

Prin combinarea G-actinei şi F-actinei cu miozina se formează G-actomiozina, respectiv F-actomiozina, având proprietăţi fizico-chimice diferite.

G-actomiozina are în soluţie vîscozitate mică, nu formează fire, nu este contractilă; în prezenţa ATF este disociată în actină şi miozină.

F-actomiozina dă soluţii puternic vîscoase, prezentând o puternică birefringenţă de scurgere; formează fire contractile şi receptive la acţiunea ATF. Se crede că în contracţie este implicată F-actomiozina şi nu G-actomiozina, şi că aceasta ar fi ceeace se credea înainte a fi miozina.

1 g muşchi ar conţine 25—30 mg actină, respectiv 12—15% din proteinele totale.

Unirea F-actinei cu miozina cu formare de F-actomiozină este caracterizată printr'o bruscă creştere a vîscozităţii şi a birefringenţei de orientare. S'a arătat că, dacă gruparea — SH a miozinei este oxidată sau substituită, se inhibă formarea actomiozinei, fapt care vom vedea că este foarte important, deoarece prezenţa grupărilor — SH libere este necesară şi pentru activitatea enzimatică a miozinei.

Deasemenea, în condiţii speciale, ATF duce la disocierea actinei de miozină, ceeace ar indica o competiţie între ATF şi actină pentru grupările — SH din molecula miozinei.

Tropomiozina este o proteină recent izolată sub formă cristalizată; este extrasă din stromă prin deshidratare cu alcool — eter, ClK, pH=7. Are greutatea moleculară 90 000 şi structură fibrilară. In absenţa sărurilor dă soluţii cu o puternică birefringenţă de scurgere şi cu vîscozitate mare; ambele sunt mult scăzute în prezenţa ClK; are multă analogie cu miozina; ar putea să fie un precursor al acesteia (Bailey).

Miozinele α, β şi γ sunt componente separate electroforetic (Dubuisson) din miozina Weber-Edsall şi miozina A şi B (Szent-Györgyi).

Miozina A conţine 25% α-, 70% β- şi 5% γ-miozină.

Miozina B conţine 90% α-, 5% β- şi 5% γ-miozină.

Soluţiile de α-miozină sunt puternic vîscoase şi birefringente. Conţin 7—8 γ P/mg N şi 1—2% lipide. Soluţiile de β-miozină sunt foarte puţin vîscoase.

Se vede că în structura sistemului contractil muscular s'a reuşit izolarea unor proteine care se deosebesc între ele prin proprietăţile lor fizico-chimice şi chimice. Din structura elementelor musculare contractile face parte un sistem proteinic complex care vom vedea că, în timpul travaliului fiziologic, suferă modificări fizico-chimice importante.

Proprietăţile enzimatice ale miozinei. In 1937, cercetătorii sovietici Engelhardt şi Liubimova au arătat faptul extrem de important că reziduul insolubil al unui extract apos sau salin (diluat) de muşchi are proprietatea de a scinda din molecula ATF gruparea PO_4H_3 terminală, trans-

Scanned with OKEN Scanner

formând ATF în ADF, deci că acest reziduu muscular are activitate adenozintrifosfatazică. Aceste observaţii au fost confirmate de diverşi cercetători. Autorii deduc din aceste experienţe că miozina, componenta contractilă din ţesutul muscular, este identică cu adenozintrifosfataza, deoarece nu s'a reuşit separarea activităţii enzimatice de suportul miozinic.

Activitatea enzimatică a miozinei are două maxime, la pH 6,5 şi pH 9. Este activată de ionii Ca^{++} şi Mg^{++}, este inhibată în concentraţii mari saline, reactivată de glutation şi cisteină, ceeace arată că prezenţa grupărilor — SH este necesară activităţii enzimatice. 100 000 g miozină transformă pe minut 600 molecule-gram ATF, deci are o activitate enzimatică slabă.

Cercetătorii sovietici au arătat că pe măsura purificării miozinei creşte şi activitatea adenozintrifosfatazică. Al doilea fapt important, constatat experimental, este că nu numai că miozina sau actomiozina au acţiune enzimatică asupra ATF, dar ATF, la rândul său, modifică în mod specific proprietăţile fizico-chimice caracteristice ale acestor proteine, şi anume vîscozitatea şi birefringenţa de scurgere. Dacă se injectează printr'un capilar o soluţie de miozină într'o cantitate mare de apă, miozina ia forma unor fibre cu activitatea ATF-azică, activitate care se păstrează multă vreme, fibrele formate având o comportare analoagă fibrelor musculare. Capacitatea de extensie se dublează la adăugare de ATF; aşa numita reactivitate mecano-chimică a fibrelor merge paralel cu activitatea ATF-azică, dar vîscozitatea şi anizotropia fibrelor scad paralel, pentru a reveni la normal când ATF este hidrolizat. In prezenţa a 0,004 mg ATF, anizotropia este redusă cu 40—60%, şi în acelaş timp elasticitatea firului de miozină este crescută cu 150—200%.

Cercetările ulterioare au arătat că acţiunea ATF este corelată şi cu modificări ale concentraţiei ionilor minerali K^{+}, Mg^{++}, Ca^{++} şi, în funcţie de echilibrul ionic din mediu, va produce fie contracţie, fie relaxare. Faptul că miozina, respectiv actomiozina, este componenta cea mai importantă a fibrilei musculare, deci suportul proprietăţilor mecanice ale muşchiului, că grupările fosfat puternic energetice din molecula ATF pot fi desfăcute cu eliberare de energie de însăşi miozina musculară şi că aceeaşi componentă purtătoare a energiei chimice din muşchi poate realiza la rândul ei modificări fizico-chimice ale fibrei miozinice însăşi, pune problema interacţiunii dintre aceste două sisteme, miozina şi acidul ATF, a corelaţiei dintre transferul energetic de pe ATF pe miozină şi a activităţii ATF-azică a acesteia. Mecanismul prin care energia este transmisă de pe molecula ATF pe miozină nu este încă cunoscut, dar faptul, dovedit de V. A. Engelhardt şi M. N. Liubimova, că proteina contractilă principală din muşchi, suportul principal al proprietăţilor mecanice ale fibrei musculare, posedă proprietăţile enzimatice ale unei adenozintrifosfataze, deci catalizează reacţia de scindare în cursul căreia se eliberează energia necesară contracţiei musculare, este de primă importanţă, ATF fiind purtătorul energiei chimice generate în cursul proceselor metabolice şi acumulate în acest compus sub formă de legături fosfat puternic energetice.

Prin lucrările lor, cercetătorii sovietici stabilesc conexiunea dintre reacţia chimică şi efectul mecanic şi dau o orientare nouă în studiul biochimiei, iniţiind ceeace autorii sovietici numesc „mecanochimia musculară". Se înţelege prin aceasta modificările chimice ale substanţei contrac-

Scanned with OKEN Scanner

tile legate de proprietăţile sale mecanice şi conduse de agenţii chimici, produse ale metabolismului funcţional al ţesutului muscular.

Problema dacă miozina este identică cu însăşi adenozintrifosfataza sau este numai suportul pe care este adsorbită această enzimă a fost mult desbătută. Nu s'a reuşit însă experimental separarea activităţii adenozintrifosfatazice musculare de proteina contractilă musculară, astfel că se admite în general că există identitate între aceste două sisteme, şi că reacţia exergonică de desfacere a legăturii fosfat puternic energetice din ATF sub acţiunea enzimatică a miozinei este intim legată de procesul de contracţie a fibrilei de miozină, respectiv de actomiozină.

Cercetări ulterioare au arătat că miozina are o mare capacitate de a adsorbi o serie de enzime proteice, ca de exemplu miokinaza, care catalizează reacţia de dismutaţie a două molecule ADF cu formare de ATF şi AA, desaminaza, care desaminează acidul adenilic, toxic, în acid inozinic şi, în general, o serie de enzime care au rol în reacţiile chimice de degradare a glucidelor, reacţii care vom vedea că sunt corelate cu activitatea musculară. Deasemenea, cercetări recente au arătat capacitatea miozinei de a forma complexe labile cu alţi compuşi care participă în contracţia musculară (fosfaţi, glicogen, cationi diverşi).

Proteine musculare caracterizate prin activitate enzimatică, în afară de miozine, sunt:

f o s f o r i l a z e l e *a* şi *b*, catalizează reacţia: glicogen + H_3PO_4 ⇄ ⇄ glucozo-1-fosfat (ester Cori).

Fosforilaza a este activă în proporţie de 65% în absenţa acidului adenilic şi 100% în prezenţa acestuia. *Fosforilaza b* e inactivă în absenţa acidului adenilic şi 80% activă în prezenţa acestuia. Sunt două forme ale aceleiaşi proteine.

100 000 g fosforilază *a* fosforilează 10 000 g glicogen la pH 6,7 la 30°, în interval de un minut.

E de notat că activitatea fosforilazei *a* asupra glucozo-1-fosfatului nu duce la glicogen, ci la un polizaharid de natura amidonului, la fracţiunea amilază.

Fosforilaza b rezultă din fosforilaza *a* prin intervenţia unei enzime care inhibă gruparea prostetică; transformarea are loc în timpul excitării muşchiului; repausul antrenează resinteza fosforilazei *a*. Inactivarea temporară a fosforilazei *a* ar constitui un mecanism reglator prin care se apără glicogenul împotriva unei distrugeri complecte în timpul oboselii.

H e x o k i n a z a este enzima care catalizează reacţia:

glucoza + ATF ⇄ glucozo-6-fosfat

G l u c o z o -1, 6-f o s f o m u t a z a catalizează reacţia:

glucozo-1-fosfat ⇄ glucozo-6-fosfat
6 % 94%

H e x o z o f o s f a t-i z o m e r a z a catalizează reacţia:

glucozo-6-fosfat ⇄ fructozo-6-fosfat
(ester Cori) (ester Robison)
75% 25%

F r u c t o z o - 6 - f o s f o f e r a z a sau fosfofructokinaza este enzima care catalizează reacţia:

ATF + fructozo-6-fosfat ⇄ fructozo-1-6-fosfat + ADF;
(ester Neuberg) (ester Harden-Young)

necesită prezenţa guaninei sau aceea a acidului ribonucleic şi a fosfaţilor anorganici.

Aldolaza catalizează reacţia:

fructozo-1—6-fosfat ⇄ dihidroxiacetonfosfatul + d-3-aldehidă fosfoglicerică
50% 50%

A fost obţinută sub formă cristalizată. Această enzimă, la pH 7,4 şi 20°, are o activitate intensă: 100 000 g enzimă cristalizată transformă 1390 mol. g hexozofosfat pe minut.

Triozofosfatizomeraza catalizează reacţia:

dihidroxiacetonfosfat ⇄ d-3-fosfogliceroaldehidă
5% 95% (ester Fischer)

D-3-fosfogliceroaldehiddehidrogenaza catalizează reacţia:

1-3-fosfogliceroaldehidă + cozimază + H_3PO_4 ⇄ acid difosfo-1-3-gliceric + dihidrocozimază.

Difosfo-1, 3-glicerofosfoferaza este enzima care catalizează transformarea următoare:

acidul 1-3-difosfogliceric + ADF ⇄ acid fosfo-1-3-gliceric + ATF.

Ar avea structura unei nucleoproteide.

Acid glicero-3, 2-fosfomutaza catalizează reacţia:

acid fosfogliceric ⇄ acid fosfo-2-gliceric.

Enolaza catalizează reacţia:

acid fosfo-2-gliceric ⇄ acid enolfosfopiruvic; e inhibată de fluoruri, deoarece conţine Mg în moleculă.

Fosfopiruvofosfoferaza este enzima care catalizează reacţia:

acid enolfosfopiruvic + ADF ⇄ acid piruvic + ATF: necesită prezenţa K^+; are o activitate foarte mare: 100 000 g enzimă defosforilează într'un minut 6000. mol. g acid fosfopiruvic.

Piruvodehidrogenaza catalizează reacţia acid piruvic + + dihidrocozimază ⇄ acid lactic + cozimază.

Miokinaza catalizează reacţia de dismutaţie:

ADF + ADF ⇄ ATF + AA;
40% 60%

este o enzimă extrem de rezistentă la căldură.

ATF şi ADF-fosfoferaza este enzima care catalizează transfosforilarea între ATF şi ADF şi creatină.

ATF creatinfosfoferaza catalizează reacţia:

ATF + creatină ⇄ ADF + fosfocreatină.

ADF creatinfosfosferaza catalizează reacţia:

ADF + creatină ⇄ AA + fosfocreatină.

Acid adenilicdesaminaza şi adenozindesaminaza sunt două enzime, care catalizează reacţia de desaminare a acidului adenilic, respectiv a adenozinei.

BIOCHIMIA CONTRACŢIEI MUSCULARE

Cunoştinţele asupra contracţiei musculare încep cu experienţele clasice făcute în 1907 (Fletcher şi Hopkins), în care se constată că în timpul contracţiei musculare, în condiţii anaerobe (în prezenţa N), are loc o acumulare de acid lactic. In aceste condiţii, după câteva contracţii muşchiul

devenit complect inexcitabil, dar, repus în atmosferă de oxigen, recapătă capacitatea de a se contracta, iar paralel, acidul lactic dispare treptat. Deci, un prim fapt experimental în cunoaşterea mecanismului chimic care întovărăşeşte fenomenul contracţiei musculare : *în condiţii anaerobe, contracţia este întovărăşită de apariţia de acid lactic ; în condiţii aerobe, acest acid lactic dispare.*

Câţiva ani mai târziu, Parnas şi Meyerhof au arătat că acidul lactic format în aceste condiţii provine din glicogen. Acesta constitue al doilea fapt experimental care stabileşte corelaţia dintre degradarea glicogenului din ţesutul muscular şi fenomenul contracţiei musculare. S'a constatat deasemenea că dispariţia glicogenului, respectiv formarea de acid lactic, merge paralel cu tensiunea desvoltată în muşchi, deci s'a pus în evidenţă conexiunea dintre formarea acidului lactic şi contracţia musculară. Acestea sunt primele experienţe ale unor reacţii producătoare de energie, corelate cu contracţia musculară în condiţii anaerobe.

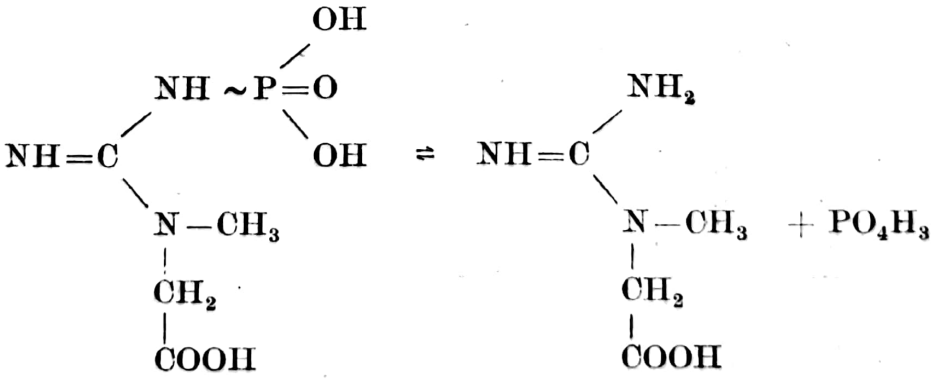
Muşchiul este de altfel, în momentul de faţă, singurul organ în care apare evident relaţia dintre modificările chimice şi travaliu.

O experienţă ulterioară fundamentală (Lundsgaard, 1920) arată că un muşchi intoxicat cu acid monoiodacetic (componentă care inhibă formarea acidului lactic prin inhibarea glicogenolizei în stadiul în care aldehida 3-fosfoglicerică e transformată în acid 1-3-fosfogliceric) are totuşi capacitatea de a se contracta un anumit interval de timp ; este aşa numita „*contracţie alactacidă*". Contracţia alactacidă are aspectul contracţiei normale, este însă de scurtă durată şi urmată de rigiditate musculară.

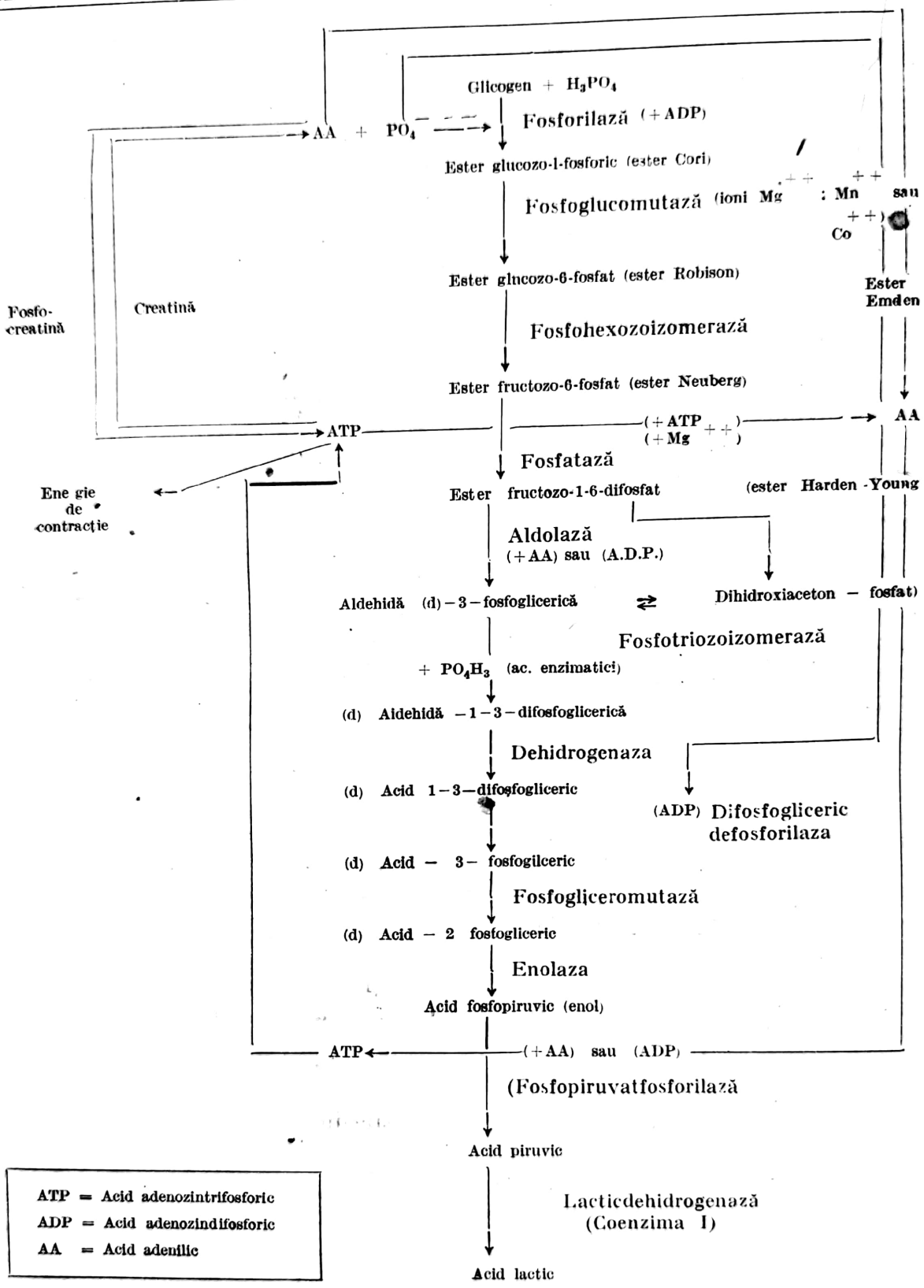
S'a constatat deasemenea că declanşarea contracţiei nu începe concomitent cu formarea acidului lactic şi că această formare se poate continua şi 30 de secunde după sfârşitul unei serii de contracţii.

Aceste fapte experimentale au atras atenţia asupra posibilităţii ca şi alte reacţii chimice decât formarea acidului lactic din glicogen să poată fi corelate cu procesul contracţiei musculare.

Astfel s'a atribuit fosfocreatinei (fosfagenului) rol în contracţia musculară. Reacţia exergonică de scindare a legăturii fosfat puternic energetice din molecula fosfocreatinei ar fi sursa energetică imediată folosită în procesul fiziologic consumator de energie al contracţiei. Acest mecanism ar explica „contracţia alactacidă" în muşchiul intoxicat cu acid monoiodacetic :



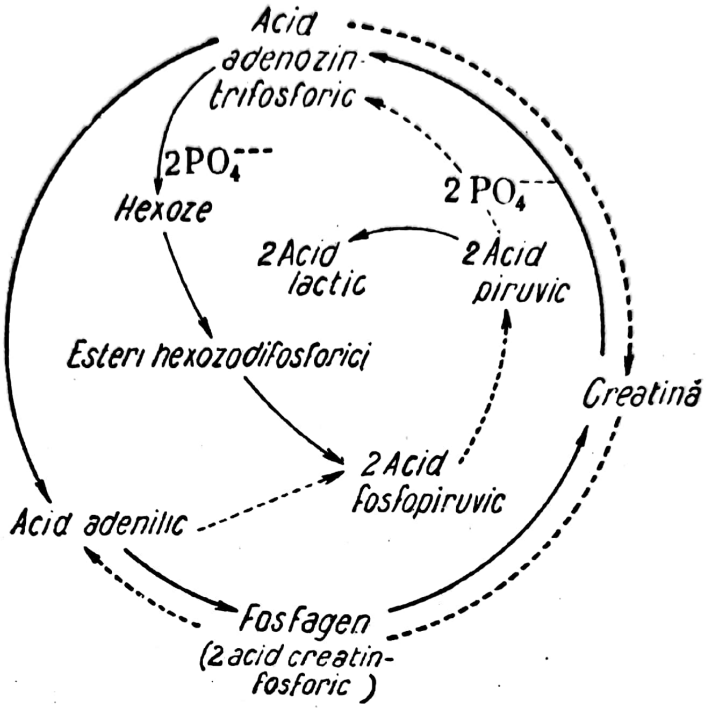
Fosfocreatina este scindată în timpul contracţiei în creatină şi fosfat, iar în timpul fazei de recuperare este reformată.



Schema generală a glicogenolizei musculare anaerobe cu intervenţia sistemelor fosfocreatinice şi adenilic

Descoperirea în țesutul muscular a altor serii de compuși fosforilați conținând grupări fosfat puternic energetice, și anume a acizilor adenilici, a dus însă în mare măsură la lămurirea mai complectă a procesului chimic care întovărășește contracția musculară și care necesită aport energetic.

Energia necesară contracției musculare poate fi eliberată de reacțiile care au loc în condiții anaerobe, deci în absența oxigenului, dar refacerea rezervei de energie acumulată în diverșii compuși chimici care au intervenit



Schema contracției musculare

în procesul contracției necesită prezența oxigenului. In procesul chimic al contracției musculare se pot deosebi astfel două faze distincte:

I. *faza anoxibiotică*, în care are loc degradarea glicogenului în acid lactic; aceasta este *faza de contracție*; și

II. *faza oxibiotică*, în care are loc reformarea glicogenului pe seama acidului lactic, energia necesară fiind dată de reacția exergonică de transformare a unei porțiuni din acidul lactic până la CO_2 și H_2O; este *faza de recuperare*.

Faza anoxibiotică cuprinde toate reacțiile expuse în schema glicogenolizei musculare, în care intervin o serie de componenți importanți pentru procesul contracției musculare, și anume, sistemul acizilor adenilici și fosfagenul (fosfocreatina), sisteme fosforilate care funcționează ca transportori de grupări fosfat puternic energetice.

Transferul de energie în procesul contracției musculare se face pe seama a două tipuri de reacții, pe seama procesului de oxidoreducere și pe seama procesului de fosforilare, procese intim legate de acest transfer. Acidul adenozintrifosforic și fosfocreatina conțin în moleculă legături fosfat puternic energetice, a căror desfacere eliberează energia care va fi folosită în procesul contracției musculare. Cercetările recente consideră ca un fapt bine stabilit că energia eliberată în procesele de oxidoreducere

celulară, sursă energetică primară a celulei, este depozitată iniţial în combinaţiile fosforice de tip special în care legătura fosfat este o legătură puternic energetică. Pentru a corela reacţiile chimice care au loc în ţesutul muscular cu însuşi procesul activităţii musculare, proces care consumă energia eliberată în aceste reacţii, este necesar a recapitula schematic fiecare etapă a glicogenolizei şi a intercala în aceste etape intervenţia fundamentală a sistemelor donatoare de grupări fosfat puternic energetice.

Prima reacţie care iniţiază degradarea glicogenului am văzut că este fosforoliza acestuia, desfacerea glicogenului la legătura 1—4 (C—O—C), cu fixarea grupării H_3PO_4 şi formare de ester glucozo-1-fosfat (ester Cori), reacţie catalizată de fosforilază, care necesită prezenţa fosfatului mineral.

A doua reacţie este un transfer intramolecular la glucozo-6-fosfat (ester Robison), reacţie catalizată de o fosfoglucomutază.

A treia reacţie este o izomerizare sub acţiunea fosfohexozoizomerazei cu formare de ester fructozo-6-fosfat (ester Neuberg).

A patra reacţie este fosforilarea acestui compus de către acidul adenozintrifosforic (ATF) cu formare de fructozo-1-6-difosfat (ester Harden-Young) şi acid adenozindifosforic (ADF) — reacţie catalizată de o fosfokinază şi care se petrece cu eliberare de energie, gruparea fosfat terminală din molecula ATF fiind o grupare puternic energetică (care eliberează prin scindare 12 000 de calorii).

A cincia reacţie este scindarea fructozo-1-6-difosfatului în două molecule de ester triozofosforic: 3-fosfogliceroaldehida şi dihidroxiacetonfosfatul, reacţie catalizată de o aldolază (zimohexaza), enzimă asociată cu miogenul A.

A şasea etapă este fosforilarea 3-fosfogliceroaldehidei în 1-3-difosfogliceroaldehidă cu ajutorul fosfatului anorganic.

A şaptea etapă este transformarea în acid 1-3-difosfogliceric în prezenţa unei dehidrogenaze, difosfopiridindehidrogenaza (difosfopiridinnucleotidul sau coenzima I), care acceptă H_2 de pe 1-3-difosfogliceroaldehidă, aceasta transformându-se în acid 1-3- difosfogliceric, dehidrogenaza reducându-se şi eliberând energie; această energie va fi utilizată în cea de *a opta etapă*, aceea a refosforilării acidului ADF în ATF (ADF rezultat din reacţia a patra, în care ATF a eliberat gruparea fosfat necesară fosforilării fructozofosfatului în fructozo-1-6-difosfat). Gruparea fosfat este cedată de acidul 1-3-fosfogliceric cu formare de acid 3-fosfogliceric şi ATF (ATF format, urmând a fi utilizat din nou pentru fosforilare cu eliberare de energie).

A noua etapă este migrarea intramoleculară a grupării fosfat a acidului fosfogliceric din poziţia 3 în poziţia 2, sub acţiunea triozomutazei.

In a zecea etapă, acidul 2-fosfogliceric, sub acţiunea enolazei, este dehidrat în *acid fosfoenolpiruvic*; prin aceasta se creează în moleculă o legătură fosfat puternic energetică care, prin desfacere, conduce la acid piruvic şi fosfat liber, reacţie catalizată de o transfosforilază în prezenţa ionilor de Mg^{++} şi K^{+} şi eliberează o cantitate mare de energie (10 000—21 000 calorii pe mol). Această grupare fosfat va refosforila ADF sau AA, reformând ATF şi acumulând din nou în acest compus o cantitate mare de energie, care va reconstitui astfel sursa energetică necesară reacţiilor endergonice. Acidul piruvic, în absenţa oxigenului, este redus la acid lactic în prezenţa lacticodehidrogenazei şi a coenzimei reduse, care este reoxidată.

Scanned with OKEN Scanner

In condiţii aerobe, coenzima redusă nu este reoxidată de acidul piruvic ca în condiţiile anaerobe, ci de oxigenul molecular, prin intervenţia altor sisteme enzimatice — fermentul galben, sistemul diacizilor tetracarbonici, sistemul citocromilor, citocromoxidazei — astfel că în aceste condiţii nu se formează acidul lactic. Dar, din acidul lactic format în condiţii anaerobe, patru cincimi sunt resintetizate la nivelul ficatului în glicogen, iar o cincime este oxidată prin intermediul acidului piruvic până la CO_2 şi H_2O pe calea ciclului tricarboxilic. Am văzut că din condensarea unei molecule de acid piruvic cu o moleculă de acid oxaloacetic şi pierderea unei molecule de CO_2 rezultă acidul cisaconitic. Acidul cisaconitic este hidratat în acid izocitric, acesta este oxidat în acid oxalosuccinic, care este decarboxilat cu formare de acid α-cetoglutaric; acesta este oxidat cu eliberare de CO_2 şi H_2O în acid succinic care, prin intermediul acidului fumaric şi malic şi trecere în acid oxaloacetic, închide ciclul. La fiecare ciclu complect, o moleculă de acid piruvic eliberează cei trei carboni sub formă de CO_2 şi două molecule de apă. In acest ciclu, molecula de acid oxaloacetic se reformează, lucrează deci ca un catalizator. Energia pe care o eliberează producerea de acid lactic din glicogen în condiţii anaerobe şi pe care o foloseşte în contracţia musculară este foarte mică faţă de energia eliberată prin oxidarea unei aceleiaşi cantităţi de acid lactic la CO_2 şi H_2O, şi anume 29 000 calorii faţă de 325 000 calorii.

ROLUL ACIZILOR ADENILICI ŞI FOSFAGENULUI IN TRANSFERUL ENERGETIC

Sistemul acizilor adenilici

In travaliul muscular se disting două perioade: perioada de contracţie şi perioada de decontracţie. Contracţia este întovărăşită de desfacerea hidrolitică a ATF, iar decontracţia, de desfacerea hidrolitică a fosfagenului. ATF şi fosfocreatina fiind astfel generatorii energetici imediaţi.

Faza anaerobă. Din înşiruirea reacţiilor chimice care au loc în faza anaerobă, care corespunde fazei de contracţie, se vede cât de importante sunt procesele de fosforilare în care intervine ca donator de grupare fosfat puternic energetică *acidul adenozintrifosforic* (ATF) şi ca acceptori specifici ai acestor grupări, *acidul adenozindifosforic* (ADF) şi *acidul adenilic* (AA). Gruparea fosfat puternic energetică terminală din acidul adenozintrifosforic este scindată, sub acţiunea enzimatică a adenozintrifosfatazei, acţiune care am văzut că este asociată cu însăşi miozina musculară, proteina contractilă din muşchi. Energia eliberată prin desfacerea grupărilor fosfat puternic energetice este folosită în procesul consumator de energie al contracţiei, astfel că regenerarea permanentă a acestor legături este indispensabilă. Dintr'o moleculă de hexoză rezultă în condiţii anaerobe două molecule de acid piruvic; transformarea implică utilizarea a două legături fosfat puternic energetice şi duce la crearea altor patru legături puternic energetice, deci două legături fosfat puternic energetice sunt create în sistem şi pot fi folosite în această fază prin intervenţia acidului adenozintrifosforic.

Acidul adenozintrifosforic (ATF) intervine ca donator de grupare fosfat în fosforoliza glicogenului, în formarea esterului hexozo-1-6-difosforic (ester Harden-Young). Regenerarea acidului adenozintrifosforic este asigurată pe trei căi, şi anume: pe seama *fosfocreatinei* (fosfagenului), *pe seama acidului fosfopiruvic*, iar când aceste două căi principale au fost

epuizate, se regenerează direct pe seama acidului *adenozindifosforic*. Din două molecule de acid adenozindifosforic rezultă, sub acţiunea enzimatică a miokinazei, o moleculă de ATF şi una de AA :

$$2\ ADF \xrightarrow[\text{miokinaza}]{} ATF + AA$$

Prima cale, aceea care are loc pe seama fosfocreatinei, este importantă la începutul contracţiei sau pentru durate scurte ale contracţiei.

Fosfocreatina are rolul important de a *menţine rezerva* de legături fosfat puternic energetice uşor accesibile pentru regenerarea ATF, în prima fază a contracţiei, când nu există în sistem alţi donatori de grupare fosfat.

Regenerarea se poate face însă ulterior pe seama compuşilor care apar în sistem în însuşi procesul glicogenolizei, compuşi care conţin grupări puternic energetice, cum este acidul fosfoenolpiruvic, care cedează gruparea fosfat în mod specific acidului ADF, AA sau creatinei. Se credea la început că fosfocreatina, ca atare, pune la îndemână, direct, energia necesară contracţiei. Ulterior s'a dovedit că acest fapt nu este exact şi că rolul ei este foarte important pentru resinteza ATF, fosfocreatina fiind sursa de fosfat puternic energetică necesară acestei resinteze. Fosfocreatina constitue astfel rezerva de energie fixată sub formă de legături fosfat care duce la regenerarea ATF. Reacţia este următoarea (reacţia Lohman) :

Fosfocreatină + ADF $\rightleftarrows$ Creatină + ATF

Reacţia este reversibilă, dar orice cauză care duce la un consum al ATF, ca de exemplu contracţia musculară, va orienta reacţia în sensul reformării ATF, iar orice reacţie care va duce la o acumulare de ATF ca de exemplu glicoliza şi oxidarea, va dirija reacţia în sensul regenerării fosfocreatinei.

Legătura puternic energetică din fosfocreatină, a cărei desfacere eliberează 10 000 calorii pe gram-mol. fosfat, este transferată astfel în molecula ATF şi constitue aci sursa energetică directă şi imediată a energiei potenţiale necesară contracţiei musculare.

Având în vedere acest rol important al fosfocreatinei, resinteza acesteia este indispensabilă; ea se face pe seama grupărilor fosfat puternic energetice care se creează în sistem în cursul glicogenolizei printr'un proces cuplat de oxidoreducere pe seama acidului fosfoenolpiruvic sau printr'o reversibilizare a reacţiei Lohman (pe seama deci chiar a acidului adenozintrifosforic reformat între timp din alţi compuşi fosforaţi care rezultă în cursul glicogenolizei musculare şi care există în acest moment în exces în sistem).

Rezerva de legături fosfat puternic energetice se menţine în organism atâta timp cât există un echilibru dinamic între procesele anaerobe glicolitice şi cele oxidative aerobe.

Cele patru reacţii care, în stadiul actual al cunoştinţelor, pot fi considerate ca fiind implicate în contracţia musculară, sunt următoarele :

Reacţia 1 : acid adenozintrifosforic (ATF) $\rightleftarrows$ acid adenozindifosforic (ADF) + PO_4H_3

„ 2 : fosfocreatină (F.C.) $\rightleftarrows$ creatină (C) + PO_4H_3

„ 3 : glicogen $\rightleftarrows$ acid lactic

„ 4 : glucide $\rightarrow$ CO_2 + H_2O

Aceste reacţii sunt corelate şi condiţionate între ele, fiecare fiind condiţionată de cea anterioară. Primele trei reacţii furnizează direct energia necesară contracţiei musculare şi sunt reacţii reversibile care au loc în anaerobioză; cea de a patra reacţie este ireversibilă, are loc în aerobioză şi este sursa indirectă a energiei necesare contracţiei prin posibilitatea pe care o oferă de a regenera componentele chimice care iau parte la primele trei reacţii din etapa anaerobă.

Dintre toate reacţiile enumerate ca *participând în procesul glicogenolizei musculare, aceea care intervine imediat şi exploziv ca sursă energetică de contracţie este scindarea grupării fosfat din acidul adenozintrifosforic*: ATF ⇄ ADF + PO_3H_3.

Prin desfacerea legăturii fosfat terminale se eliberează 12 000 calorii pe gram/mol/fosfat eliberat. Argumentele care au dus la interpretarea că desfacerea grupării fosfat terminale din ATF este sursa energetică imediată a contracţiei, sunt următoarele:

1. este o reacţie puternic energetică;
2. este, în timp, prima reacţie exergonică care are loc în procesul contracţiei musculare;
3. este extrem de rapidă;
4. metode fizice de mare precizie au arătat că descompunerea ATF coincide în timp cu procesul contracţiei musculare;
5. desfacerea ATF este catalizată de însăşi miozina, proteina contractilă din ţesutul muscular, care are deci acţiunea enzimatică a unei adenozintrifosfataze, acţiune care nu se exercită asupra fosfocreatinei.

Deşi fosfocreatina conţine o legătură fosfat puternic energetică, care ar putea fi folosită direct în contracţia musculară, ea nu poate fi sursa primară a energiei necesare contracţiei, aşa cum se credea iniţial, deoarece desfacerea grupării fosfat din molecula sa necesită prezenţa în sistem a acidului adenozindifosforic (ADF) sau adenilic (AA) ca acceptori specifici ai acestei grupări fosfat, ori aceştia, la rândul lor, nu pot proveni decât din desfacerea prealabilă a acidului adenozintrifosforic (ATF). Energia creatinfosfatului nu poate fi astfel folosită direct, ci numai prin intermediul ATF, care-i pune la îndemână acceptorii grupării sale fosfat. Fosfocreatina oferă însă gruparea fosfat puternic energetică necesară resintezei ATF la începutul contracţiei sau pentru durate scurte ale acesteia, ATF putând fi regenerat ulterior, în cursul unei contracţii susţinute, pe seama compuşilor fosforilaţi rezultaţi în procesul de glicogenoliză. Fosfocreatina este astfel un rezervor energetic accesoriu. Am văzut că regenerarea ATF se face pe următoarele căi:

1) fosfocreatină + ADF ⇄ ATF + creatină
2) ADF + acid fosfopiruvic ⇄ ATF + acid piruvic
3) ADF + PO_3H_3 ⇄ ATF
   (pentru o reacţie cuplată de oxidoreducere)
4) 2 ADF $\xrightarrow{\text{miokinaza}}$ ATF + AA

Din aceste căi posibile, prima este aceea în care fosfocreatina oferă calea cea mai rapidă de reformare a ATF şi am văzut că resinteza fosfocreatinei este asigurată pe de o parte de procesul exoterm de desfacere a acidului fosfopiruvic în acid fosforic şi piruvic, şi pe de altă parte de fos-

Scanned with OKEN Scanner

faţii minerali, ambele procese fiind legate la rândul lor de prezenţa în sistem a ATF reformat el însuşi între timp pe alte căi.

A doua cale este oferită de legăturile puternic energetice generate în cursul glicogenolizei şi constitue sursa principală în cazul când activitatea este prelungită.

Recapitulăm ciclul reacţiilor în care intervine transportul grupării fosfat puternic energetice şi de care este legată eliberarea energiei folosite în travaliul muscular. In faza iniţială de inducţie, care constitue şi faza de contracţie, când se realizează un impuls nervos, acidul ATF se dedublează cu formare de ADF şi PO_4H_3 (acesta din urmă va servi la fosforilarea hexozelor) şi are loc eliberarea de 12 000 calorii pentru fiecare moleculă gram ATF.

ATF se reconstitue endoterm pe seama energiei eliberate în reacţia de scindare rapidă a fosfocreatinei în creatină şi acid fosforic (care va reforma ATF). ATF reformat se dedublează în ADF şi o moleculă de PO_4H_3, care restabileşte rezerva de fosfaţi minerali necesari fosforolizei. ADF se scindează în AA şi PO_4H_3, care fosforilează esterii hexozomonofosforici.

Acidul adenilic este rapid regenerat (deoarece, fiind un toxic puternic, odată format este desfăcut imediat în ţesutul muscular în acid inozinic şi amoniac, deci s'ar pierde rezerva de acizi adenilici). Regenerarea se face fie pe calea fosfagenului, fie pe calea acidului fosfopiruvic. Deci, în faza anaerobă, faza de contracţie, dispare fosfocreatina, dispare o parte din glicogen, apare în reacţie PO_4H_3 liber, acid lactic; acidul ATF este reformat imediat deci rămâne nemodificat. In faza a doua, de recuperare anaerobă, fosfocreatina este resintetizată, dispare creatina, dispare fosfatul anorganic liber, dispare glicogenul, apare acidul lactic. ATF rămâne muscular. Această fază durează 30 de secunde.

Fosfocreatina este reformată din creatină, care a rămas între timp ca atare în muşchi şi din fosfaţii din ATF care la rândul lui, a fost resintetizat din acidul fosfopiruvic +AA şi din fosfaţii minerali +AA, reacţii cuplate cu reacţia de oxidoreducere. Deci, în faza de recuperare anaerobă apare din nou creatinfosfatul, dispare o parte din glicogen şi fosfaţi, apare acidul lactic. Toate reacţiile de care am vorbit sunt astfel înlănţuite, încât nu există pierderi de energie iniţială, în sensul că reacţiile exoterme lucrează cuplat cu cele endoterme, astfel că energia eliberată de reacţiile exergonice este utilizată de reacţiile endergonice. Am văzut că atât în faza de contracţie, cât şi în aceea de recuperare anaerobă, dispare glicogenul şi apare acidul lactic; s'ar putea deci, la un moment dat, să dispară stocul de glicogen. Acest lucru este însă remediat printr'o sinteză, o reformare a glicogenului din acid lactic în condiţii aerobe, energia necesară acestei sinteze fiind dată de reacţia puternic exotermă de combustie a acidului lactic în CO_2 şi H_2O.

Această reacţie cuplată cu *sinteza glicogenului din acidul lactic (4/5) cu combustia unei mici cantităţi de acid lactic (1/5) în CO_2 şi H_2O constitue reacţia Pasteur-Mayerhof* şi face posibilă regenerarea glicogenului muscular.

Faza oxibiotică a contracţiei musculare este dată de reacţia Pasteur-Mayerhof. In această fază, 1/5 din acidul lactic este oxidat complect pe calea ciclului izocitric până la produsele finale, CO_2 şi H_2O.

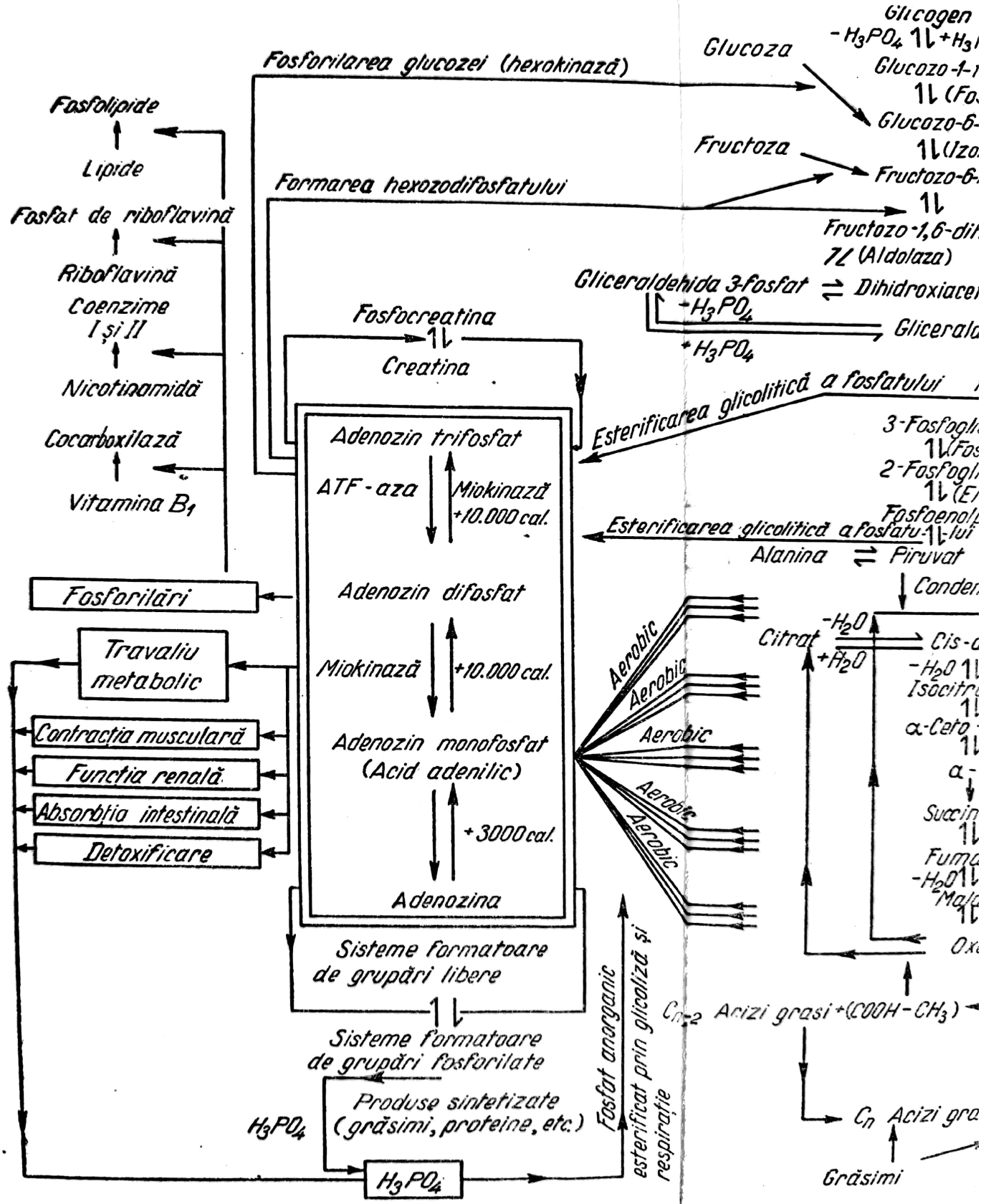
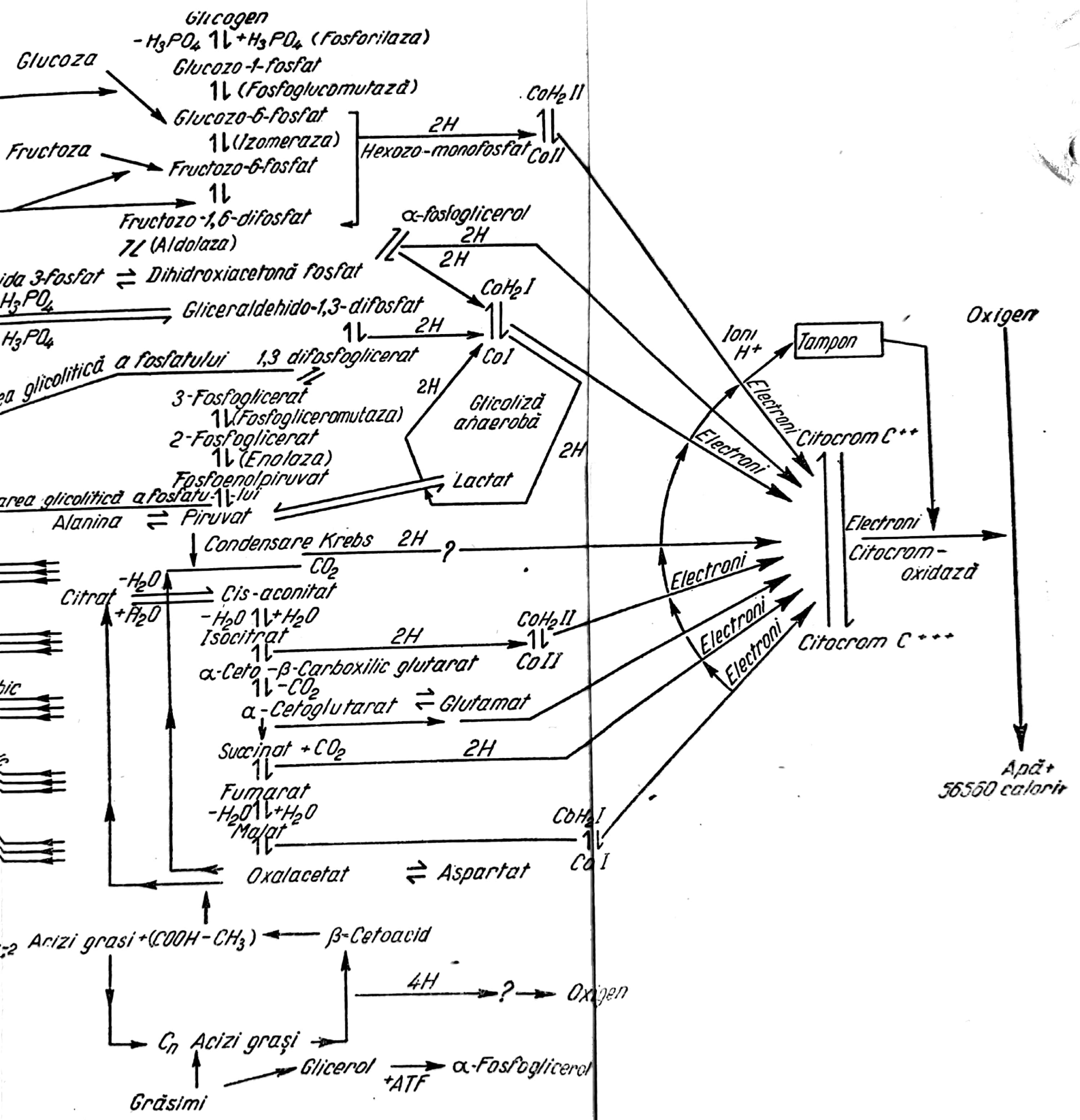


Fig. 121. Transformarea biologică a energiei. Interrelația dintre



...ological a energiei. Interrelația dintre sistemele de fosforilare, glicolitice și respiratorii.

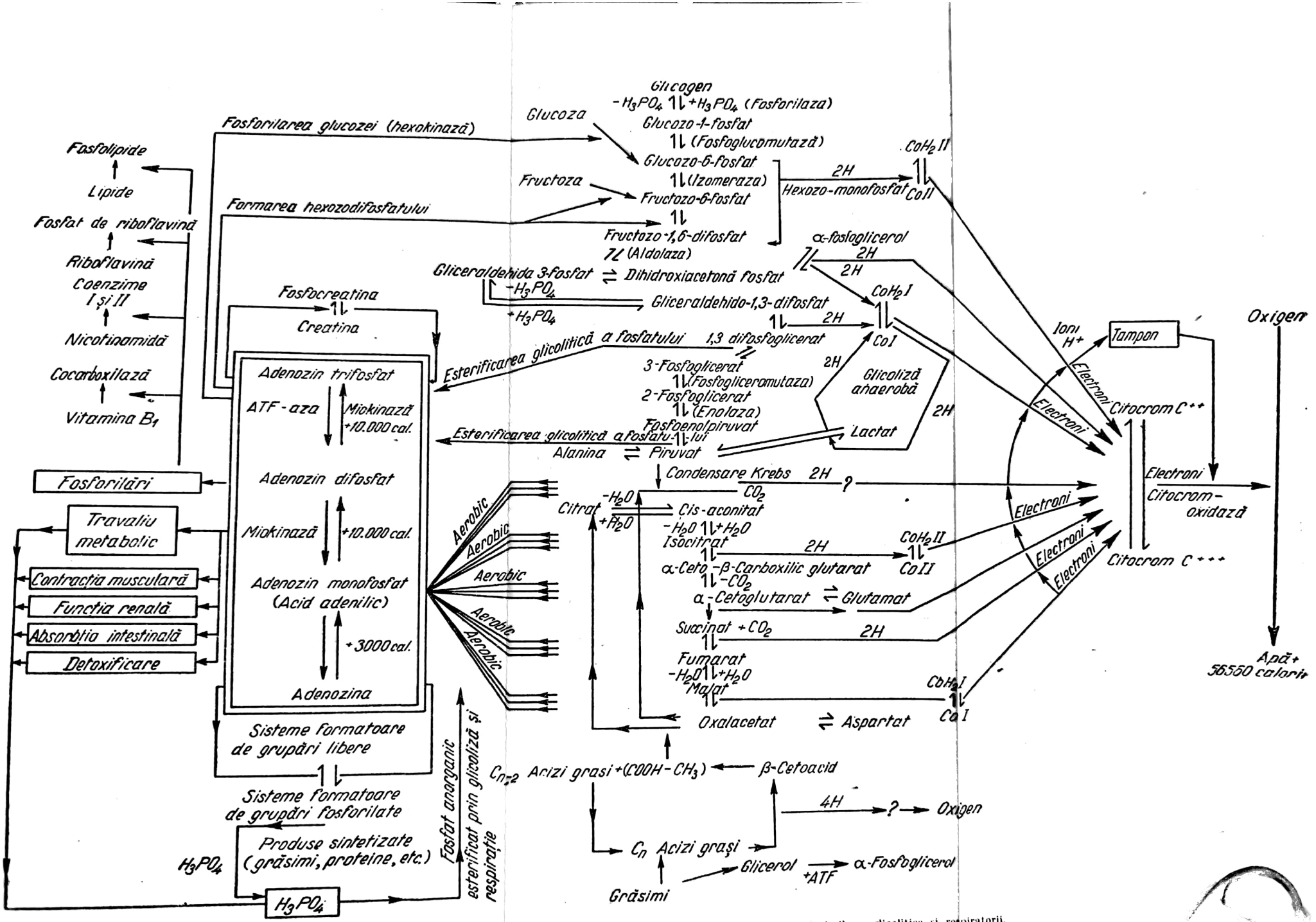


Fig. 121. Transformarea biologică a energiei. Interrelația dintre sistemele de fosforilare, glicolitice și respiratorii.

Scanned with OKEN Scanner

Transformările energetice în contracţia musculară

Seria reacţiilor chimice care eliberează energia potenţială necesară contracţiei musculare ar fi, în ordinea intervenţiei lor, următoarea:

1. **clivajul grupării fosfat din ATF** (reacţia este catalizată de adenozintrifosfatază) (miozină);
2. **resinteza ATF prin intervenţia fosfocreatinei;**
3. **degradarea glicogenului în acid lactic** pune la dispoziţie energia necesară regenerării fosfocreatinei prin compuşi fosforilaţi intermediari formaţi în acest proces de degradare, şi anume, acidul fosfopiruvic.

Aceste trei reacţii pot avea loc în absenţa oxigenului. In prezenţa oxigenului are loc cea de a patra reacţie, şi anume:

4. **oxidarea acidului lactic (1/5)** care pune la îndemână energia necesară resintezei glicogenului (din restul de 4/5 de acid lactic).

Lanţul reacţiilor „cuplate", care pornesc dela desfacerea explozivă a acidului adenozintrifosforic şi se continuă până la degradarea lentă anoxibiotică şi oxibiotică a glicogenului, este redat în capitolul următor, care cuprinde bilanţul energetic al reacţiilor chimice ce întovărăşesc travaliul muscular.

BILANŢUL ENERGETIC AL REACŢIILOR CHIMICE

Formarea acidului lactic poate fi urmărită din punct de vedere energetic, dacă se iau în seamă foarte sistematic reacţiile care au loc în diverse etape;

1. Un mol hexoză + 2 PO_4H_3 → ester hexozodifosforic. Formarea esterului hexozodifosforic este o reacţie care se petrece fără degajare marcată de căldură:
2. Ester hexozodifosforic → 2 ester triozofosforic — 14 000 calorii
3. Ester triozofosforic → 2 acid fosfogliceric + 30 000 calorii;
4. Acid fosfogliceric → 2 acid piruvic + 2 PO_4H_3 + 16 500 calorii.

Energia imediat necesară contracţiei nu este însă dată direct de degradarea glicogenului, această reacţie fiind relativ lentă; rolul ei este de a reforma componentele din sistem care conţin legături fosfat puternic energetice şi a căror descompunere rapidă pune în libertate energia ce poate fi folosită imediat în travaliul muscular. Acest compus am văzut că este acidul adenozintrifosforic, reformat la rândul său pe seama fosfocreatinei.

Cele patru procese chimice care sunt implicate în travaliul muscular sunt astfel:

1. acid adenozintrifosforic ⇄ acid adenozindiforsforic + acid fosforic + 12 000 calorii (energia de contracţie)
2. fosfocreatină + acid adenozindifosforic ⇄ creatină + acid fosforic + 10 000 calorii (energie folosită pentru resinteza ATF)
3. glicogen (1 echivalent hexoză) ⇄ acid lactic + 29 000 calorii (energie folosită pentru resinteza ATF şi fosfocreatinei)
4. acid lactic + $3O_2$ → $3\,CO_2 + 3\,H_2O$ + 325 000 calorii (energie folosită pentru resinteza glicogenului).

Primele trei reacţii sunt reversibile şi au loc în faza anaerobă, reprezentând sursa imediată de energie necesară contracţiei musculare în condiţii anaerobe.

Scanned with OKEN Scanner

Succesiunea reacţiilor este aceea de mai sus, fiecare din ele fiind reversibil-posibilă pe seama reacţiei imediat următoare.

Sunt interesante şi cantităţile relative de energie eliberate de diversele reacţii. Un gram de muşchi proaspăt are un astfel de conţinut în ATF, fosfocreatină şi glicogen încât poate elibera 0,04 calorii mari în reacţia (1), 0,23 calorii mari în reacţia (2) şi 1,2 calorii mari în reacţia (3). Sinteza continuă a ATF şi a fosfocreatinei face ca această energie să fie mereu crescută; energia provenită din reacţiile în condiţii anaerobe este însă limitată şi dependentă de energia eliberată în cursul reacţiilor de degradare ale glicogenului în acid lactic, ceeace reprezintă însă un aport minim. Deabia reacţia (4), oxidarea aerobă a glucidelor, aduce energia necesară resintezei componentelor care intervin în reacţiile anaerobe şi care dau între 30—60 calorii mari pe gram muşchi proapăt. Extensia cantităţii de energie datorită acestor reacţii depinde, la rândul ei, de raportul dintre oxigen şi substrat. In muşchiul care se contractă lent, în abundenţă de oxigen, există un aport mare de energie datorită acestei reacţii (vezi tabelul 32).

Tabelul 32

			Pentru 1 g muşchi
Contracţia	Acid adenozintrifosforic	exoterm ⇄ endoterm	AA + $2PO_4H_3$: 0,04 cal. mari
	Fosfocreatină	exoterm ⇄ endoterm	2 PO_4H_3 + creatină : 0,23 cal. mari
Stadiul de reparare anaerobă	Acid adenozintrifosforic	exoterm ⇄ endoterm	AA + PO_4H_3 : 0,04 cal. mari
	Glicogen aerob	exoterm ⇄ endoterm	Acid lactic : 1,2 cal. mari
Faza de reparare aerobă	Acid lactic	exoterm →	CO_2+H_2O : 30 — 60 cal. mari

Procesul energetic care declanşează energia imediat utilizată în contracţie şi care procură energia de contracţie este desfacerea legăturii puternic energetice din ATF. Această desfacere eliberează 10 000 calorii. ADF funcţionează ca acceptor al grupării fosfat puternic energetică din molecula fosfocreatinei. Degradarea glicogenului în acid lactic procură energia pentru resinteza fosfocreatinei, iar resinteza glicogenului din acidul lactic este asigurată pe seama oxidării şi a aproximativ 1/5 din acidul lactic format. Această reacţie de oxidare eliberează energia necesară acestei sinteze şi, în ultimă analiză, glicogenul reprezintă rezerva energetică musculară.

Sistemul acizilor adenilici, acidul ATF şi ADF, constitue numai transportorii energiei acumulate în legăturile fosfat puternic energetice, iar fosfocreatina, rezervorul acestor grupări fosfat puternic energetice rezul-

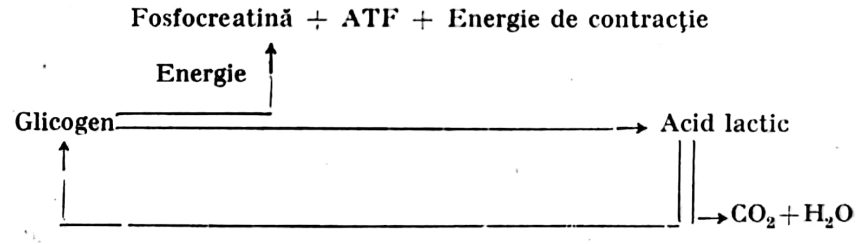
Scanned with OKEN Scanner

tate din procesele glicogenolitice. Problema transferului de energie chimică acumulată în energia mecanică pentru realizarea travaliului muscular este o problemă de primă importanță. Strânsa legătură dintre proteina musculară, miozina și ATF, pusă în evidență de cercetătorii sovietici Engelhardt și Liubimova, reprezintă în această problemă un punct crucial.

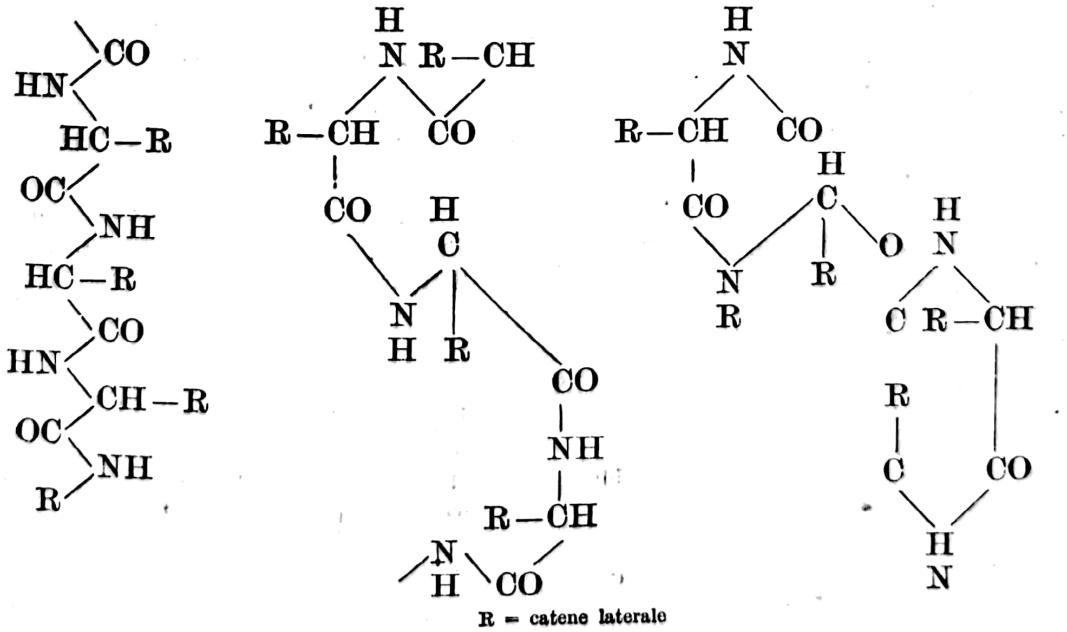
Prin această descoperire, reacția chimică și efectul mecanic, adică contracția actuală musculară, apar ca strâns asociate.

Procesul chimic fundamental prin care se eliberează această energie a contracției musculare am văzut că este desfacerea acestei legături fosfat, deci se vede strânsa legătură dintre ATF, sursa energetică și miozină, elementul contractil al mușchiului care realizează travaliul mecanic. Problena care se pune este, în ce chip reacția chimică de desfacere a ATF, sub acțiunea catalitică a ATF-azei (miozina), produce modificările chimice și coloidale în mușchi, respectiv scurtarea și îngroșarea fibrei musculare, adică însăși contracția acestei fibre.

Cercetările cu ajutorul spectrelor de difracție cu raze X au arătat că lanțurile polipeptidice ale fibrei de miozină, repliată parțial în stare de relaxare, se repliază intens în stare de contracție și mult mai intens în stare de supercontracție. Spectrele de difracție cu raze X pentru mușchi și pentru miozină, sunt asemănătoare cu ale keratinei, o altă proteină fibrilară.



Catena polipeptidică a miozinei în diversele forme de repliere



I. Stare de extensie II. Stare de contracție III. Stare de supercontracție

Miozina este formată din molecule lungi sub formă de bastonaşe, formând micele lungi. In muşchi, aceste micele sunt orânduite coaxial, paralele între ele, aşa cum rezultă din dubla refracţie şi spectrul cu razeX. Dubla refracţie a muşchiului arată că, în discurile anizotrope, aceste fibrile primitive sunt paralele între ele, pe când în discurile izotrope, orânduirea este mai neregulată.

Spaţiile intermicelare permit o deplasare şi acumulare de apă. Contracţia şi relaxarea sunt corelate cu modificări ale imbibiţiei şi desimbibiţiei sub influenţa a diverşi ioni şi depind de interacţiunea dintre aceşti ioni şi moleculele proteinei contractile. Volumul muşchiului scade în timpul contracţiei; această descreştere ar fi datorită apariţiei de noi ioni K^+, care are loc în timpul excitaţiei.

In tetanos se eliberează 0,2—0,7 mg K şi are loc o scădere de volum de 0,02—0,1 cc pe gram. Contracţia musculară corespunde unei scurtări a catenei miozinice în urma unor modificări chimice ale mediului sarcoplasmatic şi ar fi datorită transformării reversibile a catenelor paralele în lanţuri care devin înclinate pe axă.

Cercetările cu ajutorul razelor X indică spectre de difracţie pentru muşchi şi pentru miozină, analoage cu ale keratinei, care se ştie că are deasemenea structură fibrilară. Starea de contracţie corespunde unei replieri a fibrei miozinice, starea de supracontracţie unei replieri mai intense.

In ansamblul proceselor care întovărăşesc travaliul muscular se disting două perioade : perioada de contracţie şi perioada de decontracţie. Decontracţia ar fi caracterizată chimic prin hidroliza fosfagenului, contracţia este întovărăşită de hidroliza ATF, deci fiecăreia din fazele de activitate musculară îi corespunde un metabolism specific. Studiul relaţiilor dintre miozina contractilă constituită din miozina şi generatorii de energie, în special ATF, apare extrem de important.

Am văzut că între aceste două sisteme există o interacţiune, în sensul că miozina este purtătorul specific al activităţii enzimatice care hidrolizează ATF, eliberând energia folosită imediat în travaliul muscular şi ATF, la rândul său, modifică proprietăţile fizico-chimice ale fibrei miozinice, deci are acţiune asupra formei moleculei, asupra forţelor intermicelare.

Corelate cu activitatea musculară, proteinele musculare suferă modificări profunde care au fost puse în evidenţă prin cercetări electroforetice.

Szent-Györgyi şi colaboratorii au pus în evidenţă corelaţia dintre acţiunea ATF asupra miozinelor şi modificările în concentraţiile ionilor minerali K^+, Mg^{++}, Ca^{++}, în funcţie de echilibrul ionic; acţiunea ATF asupra actomiozinei poate fi în sensul unei contracţii sau unei relaxări.

Szent-Györgyi interpretează procesul de contracţie a actomiozinei în prezenţa ATF ca un proces de dehidratare întovărăşit de o creştere a energiei libere din sistem, este deci un proces spontan, actomiozina contractată reprezentând astfel o stare de energie liberă mai slabă, astfel că procesul de relaxare, procesul de restabilire a structurii miozinice este procesul consumator de energie. Din acest motiv, energia exterioară necesară activităţii musculare va fi folosită în procesul de relaxare musculară.

După Szent-Györgyi, energia eliberată prin desfacerea legăturii fosfat puternic energetice este folosită pentru a readuce sistemul actomiozinic

la relaxare. Nu se ştie precis prin ce mecanism este transmisă această energie actomiozinică. S'a constatat însă că actomiozina are activitatea ATF-azică numai în starea sărac energetică, de contracţie, şi formarea actomiozinei bogat energetice relaxate corespunde unei acumulări de energie din ATF, astfel că ar exista indicaţia că în fibrilele musculare energia adusă de ATF este folosită în special în relaxare şi nu în contracţie.

Există anumite indicaţii că actomiozina se găseşte în muşchiul în repaus sub formă disociată de G-actină şi miozină. Se ştie că niciuna din ele nu este contractilă sub acţiunea ATF şi că numai F-actomiozina reacţionează cu ATF; trebue deci ca în sistem să aibă loc transformări prealabile ale G-actinei în F-actină şi s'a constatat că această transformare are loc sub acţiunea ionilor de Mg^{++}, în concentraţie adecvată de K^+.

In stimulare se ştie că are loc o acumulare a acestor ioni de K^+ şi se crede că primul efect al stimulării ar fi tocmai transformarea G-actinei în F-actină care, prin combinare cu miozina, formează F actomiozina, aceasta fiind singura implicată în contracţie. F-actomiozina poate să se contracte în prezenţa ATF şi a unui mediu ionic adecvat. Complexul contractil actomiozina-ATF are activitate ATF-azică.

ŢESUTUL NERVOS

Ţesutul nervos este neomogen în structura lui. Conţinutul în apă al substanţei cenuşii este de 83,5%. Substanţa albă este mai săracă în apă. Scoarţa cerebrală este cea mai bogată. Substanţa solidă a ţesutului nervos conţine proteine, lipide, săruri anorganice, săruri organice. Substanţele solide din creier sunt formate din 38—40% proteine, 51—54% lipide, 8—9% substanţe extractibile diverse (săruri anorganice, etc.) (valorile sunt raportate la 100 g substanţă solidă totală).

Proteinele din ţesutul nervos includ globuline, nucleoproteide şi un albuminoid, neurokeratina.

Neuroglobulina este o nucleoproteină care conţine 0,53—0,57% fosfor.

Neurostromatina e de natura nucleinelor.

Neurokeratina are proprietăţi analoage keratinei, predomină în substanţa albă a creierului şi în fibrele nervoase. In neurokeratină, raportul molecular histidină : lizină, arginină este de 1 : 2 : 2, pe când în keratinele adevărate acest raport este de 1 : 4 : 12.

Paladin studiază proteinele din creier şi constată că regiunile active din punct de vedere funcţional sunt cele mai bogate în proteine. Obţine trei fracţiuni proteinice bine caracterizate prin extracţii ale ţesutului proaspăt şi prin extracţii acetonice. Fracţiunile corespunzătoare substanţei albe şi cenuşii au acelaş punct izoelectric, dar se găsesc în proporţii diferite în diversele porţiuni ale creierului. In substanţa cenuşie, 30% sunt proteine solubile. Proteine insolubile în toţi solvenţii sunt în cantitate de 5 şi 20% în substanţa albă. Substanţele proteice extractibile cu ClK la pH = 9,1 se găsesc 28% în substanţa cenuşie, 23—24% în substanţa albă. Substanţele extractibile cu NaOH sunt în aceeaşi cantitate în substanţa cenuşie şi în substanţa albă. Diversele părţi ale creierului se deosebesc prin conţinutul lor în proteine. Azotul neproteic, determinat în diversele porţiuni ale sistemului nervos central, indică deasemenea diferenţe.

Lipidele din ţesutul nervos sunt *fosfatide*, *cerebrozide*, *sulfolipide*, *gangliozide* (care sunt o clasă de cerebrozide), *amoniolipide* şi *colesterol*.

Scanned with OKEN Scanner

Fosfatidele din creier sunt de tipul lecitinelor, cefalinelor şi sfingomielinelor. Cefalinele izolate din creier ar conţine aminoacidul serina. S'a izolat şi un inozitol-fosfatid. Printre cerebrozide se găsesc frenozina şi kerazina. Gangliozidele se găsesc în materia cenuşie. Colesterolul se găseşte în stare liberă în cantitate destul de mare în ţesutul nervos (9% din greutatea uscată). Deasemenea acesta conţine săruri (1% cenuşă), în special sub formă de fosfaţi şi cloruri.

In creier se găsesc şi o serie de alţi compuşi: creatină (55 mg %), urme de cretinină, acid creatinfosforic, glicogen, glucoză + baze purinice, colină, acid lactic, inozită (se crede că acidul creatinfosforic se găseşte în emisferele cerebrale şi în cerebel), acid ascorbic 12—25 mg la 100 g ţesut proaspăt (cerebelul fiind cel mai bogat), glutation (78 mg la 100 g), vitaminele A şi B_1, a căror carenţă cauzează turburările nervoase care însoţesc aceste avitaminoze, fosfagen (1,3 mg la 100 g), adenozintrifosfat (1,3 mg %).

In ţesutul nervos s'au pus în evidenţă şi o serie de *enzime*: catalază, peroxidază, lipază, amilază, protează, fosfatază, nucleaze, citocromoxidaze. Paladin indică prezenţa fosfatazei care scindează glucozo-1-fosfatul.

Cori constată prezenţa fosforilazei, care ar cataliza reacţia de sinteză a diverselor polizaharide (Haikine). Paladin găseşte amilază în creier şi, fapt important, atribue aci acestei enzime un rol însemnat în hidroliza glucidelor, respectiv a glicogenului. Deasemenea, Paladin arată existenţa în creier a unei fosfoglucomutaze, a adenozintrifosfatazei, a hexokinazei, a fosfoferazei, enzime care, ca şi în alte ţesuturi, intervin în metabolismul glucidic. Se constată în creier prezenţa colinesterazei şi a colinacetilazei, a carboxilazei, succindehidrazei, a carboanhidrazei.

Compoziţia chimică a diverselor porţiuni ale sistemului nervos este diferită (fig. 122, 123). Există deosebiri chimice care întovărăşesc deosebirile funcţionale ale diverselor porţiuni ale sistemului nervos. Substanţa cenuşie din creier este cea mai bogată în apă şi protide, vin apoi substanţa albă, măduva şi ulterior nervii periferici (vezi tabelul 33).

Cercetările lui A. Paladin şi E. Raşba au arătat că repartizarea azotului, creatinei şi a apei în diversele porţiuni ale creierului este aceeaşi la animale, şi anume azotul şi apa se găsesc în special în substanţa cenuşie

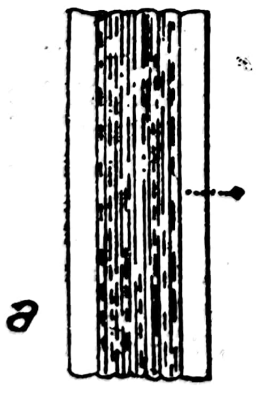
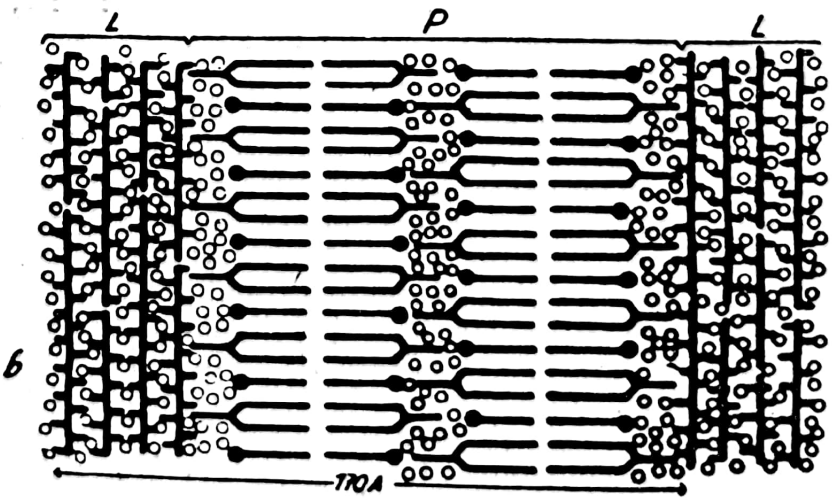


Fig. 122. Secţiune longitudinală în fibra nervoasă.



L = păturile proteinice care alternează cu lamelele lipoidice (P) – Indicaţii röntgenografice

Fig. 123. Teaca nervului (structură fină)

a emisferelor cerebrale, apoi în cerebel şi substanţa albă (vezi tabelul 34). Azotul neproteic, determinat în diverse porţiuni ale sistemului nervos central, indică diferenţe. In timpul hibernării, la castor, conţinutul în

Tabelul 33

Compoziţia globală a substanţei nervoase

	Substanţa cenuşie	Substanţa albă
Apă	80—85	68—70
Reziduu sec	15—20	30—32
Săruri	1,0	1,7
Protide	8—10	8—9
Lipide totale	6—7	18—22
Lecitine	2,60—3,16	3—4
Cerebrozide	1—2,40	4—5
Fosfolipide totale	4,62	8,20
Nesaponificabil total	0,64—1,32	4—5
Glucide totale	0,83—1,50	
Glicogen	0,40—1	

Tabelul 34

Substanţele minerale din creierul uman

Valori exprimate în grame la 1 000 g ţesut proaspăt

	Substanţa cenuşie	Substanţa albă
Apă	815	700
Cl	1,15	1,55
Na	1,10	2,15
Ca	0,093	0,140
Mg	0,204	0,407
P	2,50	4,25
K	2,90	2,75
Fe	0,06	0,06

N neproteic al tuturor regiunilor din creier este scăzut, pe când conţinutul în N total este neschimbat. Creatina se găseşte în cantitatea cea mai mare în cerebel, apoi în emisferele cerebrale şi corpul calos.

Cantitatea cea mai mare de creatină se găseşte în creierul de broască, urmează cel de şopârlă, păsări, guzgan, cobai, câine, pisică, vacă. Cantitatea de creatină scade la animalele superioare, cu excepţia peştilor.

MODIFICĂRILE CHIMICE DIN TIMPUL ACTIVITĂŢII NERVOASE

Sunt foarte importante. Metabolismul glucidic al ţesutului nervos pare să fie analog cu al celui muscular, cu deosebirea că nu pleacă dela glicogen, ci dela glucoză, ceeace explică dependenţa mai mare de aportul de glucide sanguine. Nervul consumă oxigen şi eliberează calorii în mai mare măsură în urma stimulării. Fibra nervoasă poate fi stimulată electric, termic, chimic sau mecanic. Fiecare din aceşti stimulenţi produce modificări la punctul de stimul, constituind starea de excitaţie locală, care, atunci când depăşeşte o anumită valoare, este transmisă de-a-lungul fibrei nervoase.

Transmiterea impulsului de-a-lungul nervului sau dela fibrele nervoase la fibrele musculare sau celulele secretorii implică modificări chimice importante. După unele concepţii, curentul nervos de acţiune rezultă dintr'o redistribuire a ionilor difuzibili între centri şi periferia nervilor, fenomen care are loc succesiv de-a-lungul fibrei nervoase. Această redistribuire de ioni poate fi sub controlul agenţilor chimici. Rolul acetilcolinei este important în transmiterea chimică a influxului nervos, la joncţiunea nervului cu muşchiul voluntar. Muşchiul involuntar şi celulele secretorii sunt controlate de nervii simpatici şi parasimpatici. Fibrele parasimpatice eliberează un *mediator chimic*, acetilcolina, la nivelul terminaţiei nervoase în aceste celule. Stimularea acestor nervi produce o relaxare a fibrelor musculare netede, asemănătoare cu a acelora din vasele

Scanned with OKEN Scanner

sanguine în momentul dilatării vaselor. Stimularea nervilor simpatici aduce după sine eliberarea substanţei numită simpatină şi produce constricţia vaselor. Simpatina are efect opus acetilcolinei, dar identic cu al adrenalinei.

Nervii se pot clasifica astfel în *colinergici şi adrenergici*. Fibrele nervoase colinergice includ nervii motori, fibrele preganglionare şi fibrele parasimpatice postganglionare. Fibrele simpatice sunt adrenergice. Simpatina este similară cu adrenalina în unele privinţe, dar poate fi, aparent, diferenţiată în două componente: una excitatorie (simpatina E) şi una inhibitorie (simpatina I). Acetilcolina este uneori numită parasimpatină, ea fiind tipul substanţelor parasimpaticomimetice. E un compus instabil şi repede hidrolizat în colină şi acid acetic de către acetilcolinesteraza care se găseşte în terminaţiile nervoase şi uneori de-a-lungul fibrei însăşi:

$$(CH_3)_3 \equiv \underset{\underset{OH}{|}}{N}-CH_2-CH_2OOC-CH_3 \underset{H_2O}{\rightleftarrows} (CH_3)_3 \equiv \underset{\underset{OH}{|}}{N}-CH_2-CH_2OH + CH_3-COOH$$

acetilcolină — colină — acid acetic

Reacţia este reversibilă; sinteza acetilcolinei din colină şi acid acetic a fost demonstrată în ţesutul cerebral, această reacţie necesitând legătura fosfat puternic energetică din ATF. Formarea şi desfacerea acetilcolinei ar părea să fie sub controlul acetilcolinesterazei şi colinacetilazei. Acetilcolinesteraza este reversibil inhibată de ezerină (numită şi fizostigmină). Aceasta este o metodă de studiu a formării acetilcolinei.

Studiul repartiţiei colinesterazei, a cocarboxilazei şi succindehidrazei în celula nervoasă arată că 90% din succindehidrază se găseşte în axonul gigant, localizată în axoplasmă, iar colinesteraza mai la suprafaţă. Succindehidraza este în concentraţie mai mare în nucleii cenuşii ai creierului, decât în nervi. Cocarboxilaza se găseşte în concentraţie mai mare în exoplasmă, unde probabil intervine în procesul de formare a acidului acetic şi a acidului piruvic, necesar sintezei acetilcolinei.

METABOLISMUL ŢESUTULUI NERVOS

Modificările chimice care au loc în timpul activităţii nervoase sunt foarte importante.

S'a constatat o creştere a consumului de oxigen şi a producerii de CO_2 în timpul activităţii cerebrale, deasemenea s'a demonstrat producerea de căldură ca rezultat al unui stimul. Astfel, studii făcute pe nervul sciatic la broască, indică o eliberare de 70×10^{-6} calorii pe gram/nerv pe secundă, iar în timpul stimulării are loc o creştere de căldură cu până la 40×10^{-6} calorii pe gram/nerv pe secundă. Căldura produsă de sistemul nervos central este mult mai intensă decât a fibrei nervoase. Producerea de căldură într'un interval dat de timp corespunde destul de bine cu cantitatea de oxigen consumată, indicând astfel că este o consecinţă a arderilor.

Nervul sciatic în repaus (la broască) consumă aproximativ 0,7 mm^3 0^2 pe gram pe minut, şi elimină aproximativ 0,6 mm^3 CO_2 pe gram pe minut, coeficientul respirator C. R. în repaus fiind 0,8. In timpul activităţii, consumul de oxigen creşte, iar eliminarea de CO_2 scade, astfel că C. R. este de 0,9.

Scanned with OKEN Scanner

In nervul aflat în anaerobioză în repaus, respectiv în prezența azotului, conținutul în glicogen și zahăr liber scade și are loc o acumulare de acid lactic, care atinge valoarea de 100 mg pentru 100 grame nerv în 24 de ore, și merge paralel cu consumul total al glucidelor din nerv. In nervul în repaus, în prezența oxigenului dispare zahărul liber, glicogenul rămâne neschimbat și nu are loc acumulare de acid lactic. Se crede că fibra nervoasă nu ar avea capacitatea de a degrada sau sintetiza acidul lactic cu formare de glicogen.

In nervul în repaus are loc formarea unor mici cantități de amoniac (0,3 micrograme % pe oră), cantitate care se dublează în timpul activității nervoase. Se crede că acidul adenozintrifosforic este sursa acestui amoniac. In timpul activității se constată o desfacere a fosfocreatinei și se crede că acest proces ar fi sursa imediată de energie; după trecerea impulsului nervos, ea este din nou sintetizată. In timpul activității, fosfatul anorganic crește, probabil derivând din desfacerea fosfocreatinei, a adenilpirofosfatului și fosfolipidelor.

Fibra nervoasă este foarte bogată în K. Concentrația lui este foarte diferită de o parte și de alta a membranei semipermeabile care înconjoară această fibră, raportul dintre K din interiorul și K din exteriorul fibrei fiind de 65/1.

Inegala distribuție a K și a ionilor în general, de o parte și de alta a membranei, ar juca un rol foarte important în transmisiunea curentului nervos (Bernstein). Diferența de concentrație a K condiționează potențialul de repaus. Când nervul este excitat și în absența oxigenului, K difuzează repede în lichidul care înconjoară nervul; în timpul repausului și în prezența oxigenului, K nu difuzează și se stabilește o diferență de potențial între suprafața fibrei și interior.

Un stimul aplicat nervului mărește permeabilitatea membranei la punctul de stimulare, realizând o redistribuție a ionilor, ceeace duce la o depolarizare a membranei. In acest punct, nervul devine relativ negativ față de porțiunea polarizată (inactivă) imediat adiacentă. Se naște o diferență de potențial și o curgere de curent între secțiunea activă și cea inactivă. Curentul secundar format produce un fenomen invers cu depolarizarea și activarea regiunilor adiacente. Starea de depolarizare este menținută un timp scurt după trecerea impulsului; în acest interval, nervul nu este excitabil. Revenirea la excitabilitate este dependentă de restabilirea stării de polarizare. Modificările chimice asociate cu starea de activitate duc la o creștere a permeabilității și depolarizării. In timpul recuperării, membrana este repolarizată, energia necesară fiind dată de procesele oxidative.

In prezența oxigenului, substanța cenușie din creier oxidează glucoza cu producere de acid lactic în cantități foarte mici; în condiții anaerobe, cantitatea de acid lactic este mare. In țesutul cerebral, glucoza se găsește în aceeași cantitate ca în sânge și constitue aci componenta de bază pentru respirația materiei cenușii, lucru dedus și din valoarea coeficientului respirator, egală cu o valoare în jurul unității. In substanța cenușie se găsesc cantități mici de glicogen. Glicogenul adăugat secțiunilor de creier este degradat lent la acid lactic; se pare că acidul piruvic este o etapă esențială. Consumul de oxigen al țesutului cerebral este mărit in v.tro prin adăugare de manoză, fructoză, piruvat sau lactat. Materia cenușie are un consum de oxigen mai intens decât materia albă,

Scanned with OKEN Scanner

care este formată în special din fibre nervoase. Metabolismul cortexului cerebelos ar fi mai intens decât acela al cotexului cerebral. Consumul de oxigen sporeşte însă în centrii superiori ai animalelor în creştere, probabil corelat cu creşterea importanţei funcţionale a acestora.

Pare să fie o directă relaţie între nivelul zahărului sanguin şi glucoza folosită în creier; când nivelul glicemiei scade sub o anumită limită apar confuzii mintale, convulsii, pierdere de cunoştinţă. Administrarea de glucoză, manoză, fructoză (dar nu de piruvat) înlătură aceste simptome.

Scăderea metabolismului creierului este strâns asociată cu apariţia simptomelor de hipoglicemie, deci glucoza joacă un rol special şi vital în metabolismul şi funcţiile creierului.

Nu sunt indicaţii că lipidele (colesterolul, lecitina, cefalina şi sfingomielina) în atât de mare cantitate în creier ar juca un rol funcţional special; funcţia lor pare a fi aceea de izolator al fibrelor nervoase. După Quastel şi colaboratorii, narcoticele şi anestezicele ar duce la pierderea cunoştinţei prin inhibarea sistemelor dehidrogenazice din creier. Se poate însă ca acest lucru să fie datorit unui conţinut relativ scăzut de glucide în creier şi nu depresiunii exercitate asupra coeficientului respirator.

Presiuni mari de oxigen au un efect toxic asupra sistemului nervos central. Experienţe in vitro arată că presiuni de 2,9 atmosfere oxigen menţin întreaga capacitate a ţesutului de a oxida glucidele sau compuşii intermediari. Se constată că în acest caz are loc o intoxicare a următoarelor enzime: succindehidrogenaza, fosfoglucomutaza, fructozo-6-fosfatfosforilaza, triozofosfatdehidrogenaza, piruvatoxidaza.

Se crede că acţiunea toxică se exercită asupra grupării -SH a enzimelor, ceeace ar duce la inhibarea întregului metabolism glucidic. Acţiunea toxică este înlăturată prin aport de ioni Mg^{++}, CO^{++}. Aceleaşi metale, injectate subcutanat, protejează. in vivo animalele faţă de presiunile mari de oxigen (convulsii).

Zincul, care nu protejează in vitro, are acţiune protectoare in vivo.

Acest fapt poate fi pus în legătură cu *carboanhidraza* (care se ştie că are zinc în moleculă) din ţesutul cerebral, enzimă prezentă atât în substanţa cenuşie, cât şi în substanţa albă şi care, se pare, participă direct la funcţiile speciale ale ţesutului nervos (excitaţie şi conducere), având un rol important în metabolismul cerebral.

Cercetătorii sovietici (Verbinscaia, Creps) au arătat că există o corelaţie între apariţia în scara filogenetică a carboanhidrazei şi desvoltarea funcţională generală a creierului şi sistemului nervos în general. Mersul desvoltării carboanhidrazei este caracteristic pentru fiecare specie animală şi pentru fiecare segment cerebral. In sistemul nervos central, carboanhidraza cerebrală prezintă o repartiţie caracteristică pentru fiecare specie animală. Această enzimă are probabil un rol important în menţinerea echilibrului acido-bazic în ţesutul cerebral. Studiul enzimelor din creier începe a fi urmărit în ultimii ani. S'au cercetat citocromoxidaza, sistemele dehidrazice, adenozintrifosfataza. A. V. Paladin şi şcoala lui au studiat pe creier enzimele care intervin în glicoliză (fosfoglucomutaza, hexokinaza), în cursul ontogenezei (Haichin, Goncearova, Paladin). Se constată că pentru fiecare enzimă există în cursul embriogenezei o curbă caracteristică.

Citocromoxidaza din cortexul cerebral (la porc) rămâne constantă în toată perioada embrionară şi creşte înainte de naştere.

Scanned with OKEN Scanner

Succinoxidaza e inactivă până la mijlocul perioadei embrionare, apoi activitatea ei creşte mult. Aceeaşi evoluţie o are carbonicanhidraza din creierul cobaiului.

Colinesteraza este şi ea o enzimă direct legată de activitatea nervoasă.

Contribuţia lui A. V. Paladin şi a şcolii sale este importantă în problema metabolismului glucidelor în creier. El studiază enzimele de glicoliză în creier şi constată prezenţa unei fosfataze, care scindează glucozo-1-fosfatul; lucrând pe broiaje, constată că la pH 7—8,3 glucozo-1-fosfatul e transformat în glucozo-6-fosfat sub acţiunea *fosfoglucomutazei*; la pH 6—7 are loc scindarea esterului Cori. Fapt interesant: sub *pH 5,6 — 6,5* predomină procesul de sinteză cu formarea unui polizaharid. Intre *pH 6,2—6,5*, polizaharidul format dă o coloraţie roşie cu iodul, ca şi glicogenul. Intre pH 5,6—6 se obţine un polizaharid care dă cu iodul o coloraţie caracteristică pentru dextrină şi amidon. Aşa dar, în funcţie de pH-ul mediului, fosforilaza metabolizează polizaharide (Haichin) de tipul glicogenului sau de tipul amidonului.

Paladin constată prezenţa în creier a unei *amilaze* (la vacă, cobai, câine), care are rolul să hidrolizeze substratul polizaharidic. Folosind această enzimă şi drept substrat amidonul, constată formare de dextrină. Amilaza din creier e activată de cloruri şi se activează în cursul autolizei ca şi aceea din plante. Paladin atribue acestei amilaze rolul de a degrada glicogenul pe cale hidrolitică până la maltoză; în creier există şi o maltază care face scindarea mai departe. Purifică amilaza din creier şi constată că este legată de fracţiunea albuminică. După A. V. Paladin, în creier există două enzime, amilaza şi fosforilaza, prima având rol de degradare, a doua de sinteză. Utilizarea glucozei în creier se face pe calea hexokinazei, care este foarte activă în acest ţesut; ţesutul cerebral utilizează glucoza pe calea fosforilării pe seama ATF. Se formează glucozo-1-fosfat care e folosit ulterior pentru sinteza glicogenului. El mai arată prezenţa fosfoferazei în omogenatele şi extractele din creierul diverselor animale (pH optim 7,2).

In creier se găseşte *adenozintrifosfataza* (ATF-aza) (pH 7,4—8), care nu este activată de ionii Ca^{++}, ci *de* Mg^{++}, *ATF-aza* din creier se găseşte sub două forme: una ar fi legată de o proteină cu care precipită la adăugarea de sulfit de sodiu, a doua se găseşte în soluţie. In creier există un inhibitor al ATF-azei. Aceasta are cea mai mare activitate în cerebel, urmează apoi substanţa cenuşie a emisferelor cerebrale, bulbul şi substanţa albă, cu cea mai slabă activitate ATF-azică.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL VI

BIOCHIMIA UMORILOR

SÂNGELE

Sângele constitue un adevărat țesut și poate fi conceput în totalitatea lui ca un organ. Este constituit din două faze : *plasma* și *elementele figurate*. Elementele figurate, constituite din *globule roșii*, *globule albe* și *trombocite* (plachete) sunt în suspensie în plasmă.

Volumele relative ale acestor două faze variază foarte mult dela o specie animală la alta și, pentru același individ, sunt în funcție de diversele stări fiziologice și patologice. In mod normal, elementele figurate constitue cam 40—50% din volumul sanguin total. Funcțional, elementele figurate și plasma sanguină constitue un tot nedisociabil, astfel că numai conlucrarea lor asigură rolul funcțional al sângelui. Compoziția elementelor figurate este foarte deosebită însă de a plasmei sanguine.

Sângele circulă prin vasele sanguine ale organismului sub influența acțiunii de pompare a inimii. El constitue aproximativ 5—7% din greutatea corporală. Volumul sanguin (massa sanguină) la indivizii normali este menținut în limite destul de constante ; în ultimă analiză, depinde de conținutul în apă al organismului. Menținerea constantă a volumului sanguin este posibilă prin schimbul continuu în ambele sensuri prin pereții capilarelor în raport cu nevoile imediate, excesul fiind eliminat prin rinichi și piele.

In clinică, determinarea massei sanguine este uneori importantă. Acest lucru se poate realiza prin introducerea în circulație a unor substanțe ușor de pus în evidență, nedifuzibile, cum sunt diverșii coloranți (roșul de Congo, roșul vital, albastrul tripan, derivații de hemoglobină sau substanțele radioactive). Se socoate ca măsură a volumului total de sânge gradul de diluare a substanței introduse de către sângele circulant. Volumul sângelui circulant e crescut într'o serie de boli (pletoră), apoi în timpul exercițiului muscular și la temperaturi mari. E scăzut în anhidremii, în hemoragii.

FUNCȚIILE SÂNGELUI

Se împart în două grupe mari :

I. *Funcția de vehiculare a componentelor necesare vieții celulare.* El constitue calea de tranzit a întregului metabolism celular.

Scanned with OKEN Scanner

II. *Funcţia de reglare şi menţinere constantă a proprietăţilor fizico-chimice ale mediului intern* care înconjoară celulele diverselor ţesuturi.

Celulele organismului sunt imersate în lichidul care umple spaţiile lacunare, numit şi lichid lacunar sau lichid interstiţial. Acesta constitue adevăratul mediu intern al organismului. Prin intermediul lui, sângele transmite alimentele necesare vieţii lor şi primeşte componentele inutile sau dăunătoare rezultate din transformările metabolice care au loc în celule.

Sângele transportă în celule:

1. substanţele nutritive necesare celulelor diverselor organe (rol nutritiv);
2. oxigenul necesar arderilor biologice (care constitue sursa energetică pentru organism);
3. îndepărtează CO_2 rezultat din arderile celulare (rol respirator prin aceste două mecanisme);
4. transportă organelor hormonii şi enzimele necesare (rol reglator);
5. transportă anticorpii care au rol de apărare imunologică (rol protector);
6. îndepărtează din organe şi celule produsele de degradare inutile sau dăunătoare (rol excretor).

Toate aceste funcţii enumerate mai sus pun în evidenţă rolul multiplu pe care îl îndeplineşte sângele. El constitue mediul de transport al elementelor necesare vieţii celulare, coordonând astfel activitatea diverselor organe în aşa fel ca să realizeze o acţiune unitară a tuturor organelor spre folosul întregului organism. In afară de acest rol, sângele mai are şi pe acela de a menţine şi regla constanţa condiţiilor fizico-chimice în care se desfăşoară viaţa celulară, are rolul să menţină constanţa şi fixitatea mediului intern, această constanţă fiind o condiţie indispensabilă unei vieţi celulare normale. Această fixitate a mediului intern nu este însă o fixitate statică, imobilă, ci una dinamică, deoarece în acest mediu se petrec continuu modificări, imediat compensate prin mecanisme de reglare fizico-chimice şi fiziologice propriu zise, de mare precizie. Sângele, intermediar între lichidele intercelulare care vin în contact direct cu celulele, pe de o parte, şi organele digestive, pe de altă parte, asigură menţinerea acestui echilibru dinamic lichidului intercelular şi deci asigură fixitatea (aparentă), echilibrul dinamic al mediului intern care înconjoară celula.

Organismul uman are trei constante de bază pe care reuşeşte să le menţină cu o precizie impresionantă, deşi în permanenţă intervin factori care tind să le modifice. Aceste trei constante sunt:

1. *izoionia*, adică menţinerea constantă a raporturilor ionice, care se extinde asupra ionilor Na, K, Ca şi în special asupra ionilor H^+ şi OH^-, ducând astfel la menţinerea atât de importantă a aşa zisului echilibru acido-bazic;
2. *izotonia*, adică menţinerea constantă a presiunii osmotice;
3. *izotermia*, menţinerea constantă a temperaturii în interiorul organismului.

Aceste trei constante condiţionează desfăşurarea normală a tuturor fenomenelor vieţii celulare.

Fără izoionie nu se poate menţine intactă starea coloidală a protoplasmei, fără izotonie nu se pot menţine intacte forma, mărimea, con-

Scanned with OKEN Scanner

ținutul în apă, în săruri, etc. al celulei, fără izotermie nu se poate menține independența față de variațiile atmosferice.

Izoionia și izotonia se realizează prin diverse mecanisme fizico-chimice care au loc în sânge, ceeace constitue mecanismul de reglare imediată a cărui acțiune este consolidată prin reglarea fiziologică realizată de organele de eliminare.

Izotermia este reglată deasemenea datorită apei din sânge și din lichidele tisulare. Proprietățile fizice ale apei, și anume: căldura ei specifică mai mare decât a altor lichide sau solide, conductibilitatea calorică mare și marea căldură latentă de evaporare, fac din această componentă un mediu eficace de reglare a temperaturii.

IZOTONIA

Sângele are o presiune osmotică de 7,5—8,1 atmosfere și un Δ crioscopic de (—0,55)—(—0,60°).

Limfa are valori ceva mai mari (—0,61) — (—0,64°). Menținerea izotoniei este o măsură de apărare a organismului prin care se asigură păstrarea nealterată a funcțiilor celulare. Presiunea osmotică a sângelui este dependentă de totalitatea moleculelor și ionilor care se află în sânge și corespunde osmotic unei soluții 0,168 M; 168 miliechivalenți la 1 000 cc plasmă. Concentrația ionilor Na^+ fiind de 154 miliechivalenți la 1 000 cc, sodiul intervine în proporție de 92% în acțiunea osmotică. Compușii organici, ca de exemplu ureea și glucoza, au un rol foarte mic. Pentru determinarea presiunii osmotice a sângelui s'a recurs la o metodă indirectă, și anume, la metoda crioscopică: se determină coborîrea punctului de congelare (Δ crioscopic) care, ca și presiunea osmotică, este proporțională cu numărul de particule (molecule + ioni) dintr'o soluție. Cu cât numărul acesta va fi mai mare, cu atât scoborîrea punctului de congelare a mediului în care sunt izolate va fi mai mare; deasemenea, cu cât acest număr va fi mai mare, cu atât presiunea osmotică a sistemului va fi mai mare. Astfel, apa distilată are punctul de congelare la 0°; dacă se disolvă o sare minerală, punctul de congelare scade sub zero grade și s'a constatat că o moleculă — gram de orice corp coboară punctul de congelare al apei cu aceeași valoare și anume dela 0 la — *1,87°*, oricare ar fi corpul disolvat. Pentru altă concentrație, coborîrea punctului de congelare, care se notează cu Δ, va avea altă valoare. Cunoscând această valoare Δ și greutatea moleculară a substanței, se poate calcula concentrația sa. *Sistemele* care au *acelaș* Δ *crioscopic* au și aceeași *presiune osmotică, sunt deci izotonice.*

Pentru sânge, Δ crioscopic este de (—0,55) — (—0,60°). O soluție va fi izotonică cu sângele dacă va avea aceeași presiune osmotică, respectiv acelaș Δ crioscopic, în jurul lui —0,56°.

Concentrația moleculelor + ionilor, corespunzătoare acestui Δ crioscopic, realizează o presiune osmotică care corespunde optimului de stabilitate pentru globulele roșii din plasma sanguină, și anume de 7,5 — 8,1 atmosfere. Cu această presiune acționează plasma sanguină asupra fiecărei celule. Ea nu duce la o deformare a celulelor, deoarece este echilibrată de o presiune egală din interiorul celulei. Dacă acest echilibru este perturbat prin modificări ale presiunii osmotice sanguine, are loc o alterare a funcțiilor celulare. De exemplu, o micșorare a presiunii san-

Scanned with OKEN Scanner

guine va duce la o pătrundere a apei în interiorul globulului roşu, o umflare a acestuia şi o rupere a învelişului celular cu o presiune echivalentă de 7,1 — 8,1 atmosfere. Orice creştere a presiunii osmotice din plasma sanguină va duce la o pătrundere a apei din interiorul celulei în afară, la o chircire a celulei. Variaţiile acestea de presiune, chiar dacă sunt foarte mici, produc perturbări profunde ale funcţiilor celulare, deaceea organismul tinde să menţină cât mai constantă presiunea osmotică. Izotonia sanguină apare astfel ca o reacţie de apărare a organismului, în vederea menţinerii normale a funcţiilor celulare. Cauzele care influenţează presiunea osmotică a sângelui şi în general a mediilor interne sunt de două feluri : *cauze exogene* şi *cauze endogene.*

1. *Cauze exogene* *a*) aportul de alimente sub formă solidă, ca mâncăruri sărate, poate duce la o creştere a presiunii osmotice, deci la hipertonie ;

b) aportul de alimente lichide poate duce la o scădere a presiunii osmotice, la hipotonie.

2. *Cauze endogene* *a*) desfacerea moleculelor mari în molecule mai mici şi mai multe, ca de exemplu scindarea proteinelor în aminoacizi, a polizaharidelor în monozaharide ; se ştie că presiunea osmotică e în funcţie nu de mărimea moleculelor, ci de numărul lor, deci orice creştere a acestuia va duce la o creştere a presiunii osmotice ;

b) sinteza moleculelor mari din moleculele mici va duce la o micşorare a numărului moleculelor, deci la o micşorare a presiunii osmotice, de exemplu, sinteza grăsimilor din acizi graşi şi glicerină, a proteinelor din aminoacizi ;

c) eliminarea excesivă de apă prin rinichi, intestin sau piele poate duce la hipertonie ;

d) deficienţa în eliminarea renală poate duce la hipotonie.

Cu toate aceste cauze fiziologice sau patologice care ar trebui să modifice continuu presiunea osmotică a sângelui, aceasta rămâne constantă ; organismul tinde să menţină la aceeaşi valoare numărul de particule dintr'un volum dat de sânge şi deci menţine izotonia, datorită unui mecanism de reglare destul de complicat, dar de mare precizie.

OSMOREGLAREA

Osmoreglarea sau reglarea izotoniei sanguine, se face cu o repeziciune uimitoare. Acest lucru reiese dintr'o experienţă a lui Hamburger. El injectează la cal, intravenos, 7 litri de SO_4Na_2 (sarea lui Glauber), într'o concentraţie în aşa fel aleasă încât ar trebui să-i corespundă o dublare a presiunii osmotice din sânge. Totuşi, scurt timp dela injecţie, izotonia sângelui revine la normal. Există deci o reglare rapidă a presiunii osmotice. Procesul se raportează, pe de o parte, la lichidul introdus în organism, pe de altă parte, la substanţele disolvate (deoarece presiunea osmotică depinde de numărul de *particule* (molecule + ioni) aflate într'un *volum* dat. Reglarea presiunii osmotice se va reduce la menţinerea intactă a numărului particulelor într'un volum dat. Se disting două căi de reglare a presiunii osmotice din sânge : o reglare imediată, care se face prin schimbul acestor componente între ţesuturi şi sânge, şi o reglare prin eliminare în exterior a componenţilor (disolvant sau particule disolvate), care contribue la modificarea presiunii osmotice. Prin colaborarea acestor

Scanned with OKEN Scanner

două căi de reglare se restabileşte izotonia sângelui, atunci când cauze exogene sau endogene tind să o modifice.

Reglarea imediată se face prin schimbul care are loc între sânge şi ţesuturi. E un fapt demonstrat că la câteva minute după injecţii intravenoase hipertonice sau hipotonice, deci independent de eliminarea prin rinichi, izotonia se restabileşte prin schimbul care are loc între ţesuturi şi sânge. In acest schimb, un rol special îl are ţesutul conjunctiv. Intre sânge şi celule există totdeauna o pătură cât de mică de fibre de ţesut conjunctiv, aşa că orice schimb între aceste două sisteme se face prin intermediul acestuia. Ţesutul conjunctiv are structură coloidală şi, prin aceasta, are capacitatea de a fixa cu uşurinţă apă şi de a ceda cu aceeaşi uşurinţă substanţe disolvate, adică are ceeace se numeşte capacitatea de imbibiţie şi desimbibiţie. Prin acest mecanism reuşeşte să regleze presiunea sanguină, menţinând normal numărul de particule disolvate într'un volum dat de sânge. In hipertonia sângelui, adică în cazul când există mai multe particule disolvate într'un volum dat de sânge, are loc o cedare a apei din ţesuturi, ceeace duce la o restabilire a numărului de particule într'un volum dat. In hipotonie, adică atunci când se găsesc mai puţine particule disolvate la un volum dat, are loc o eliminare a excesului de disolvant, a apei, din sânge în ţesuturi, ceeace readuce la normal numărul de particule. Are loc deci o fixare de apă din sânge în ţesuturi. Compoziţia sângelui s'a schimbat, deoarece există, în primul caz, un exces de particule disolvate faţă de normal. Cum însă acest exces e repartizat la un volum mai mare de apă, numărul de particule aflat în acelaş volum nu s'a schimbat şi izotonia a rămas intactă. In al doilea caz, deşi volumul de apă a scăzut, numărul de particule disolvate în acelaş volum a rămas acelaş; izotonia nu se modifică. Reglarea imediată prin schimbul dintre sânge şi ţesuturi duce la menţinerea presiunii osmotice sanguine, dar nu restabileşte compoziţia normală a sângelui, deoarece în primul caz am văzut că se găsesc mai multe particule disolvate în sânge decât normal şi mai multă apă, iar în al doilea caz se găsesc mai puţine particule disolvate şi mai puţină apă decât normal. Menţinerea, în ambele cazuri, a numărului relativ de particule dintr'un acelaş volum aduce cu sine menţinerea izotonicităţii.

In experienţa lui Hamburger, deşi s'a injectat un exces de sulfat de sodiu, izotonia e în scurt timp restabilită; analiza sângelui indică, cu toate acestea, o cantitate de $SO_4 Na_2$ anormală, care însă nu influenţează presiunea osmotică. Deasemenea, sângele e mai diluat decât în mod normal, prin aportul de apă din ţesuturi. Izotonia este însă păstrată, deşi ea corespunde unei stări anormale faţă de valorile absolute din sânge. Izotonia sanguină definitivă se va putea realiza deabia când se vor readuce la normal şi valorile absolute ale componentelor din sânge. Această reglare definitivă se face prin intervenţia celui de al doilea mecanism din reglare:

Reglarea prin eliminare a substanţelor care au mofidicat iniţial presiunea osmotică din organism. Presiunea osmotică reglată imediat, dar temporar, prin intervenţia ţesutului conjunctiv, poate fi modificată din nou de substanţele din apă, care se găsesc în concentrări anormale când ţesutul conjunctiv îşi epuizează capacitatea sa de imbibare sau desimbibare. Rolul rinichiului este fundamental în reglarea valorilor normale definitive şi în reglarea definitivă a presiunii osmotice în orga-

Scanned with OKEN Scanner

nism. Când rinichiul nu poate să realizeze complect rolul său, intervine ca organ ajutător intestinul.

Rinichiul este organul prin excelenţă osmoreglator, în mecanismul de reglare prin eliminarea din organism a excesului de substanţe sau apă din sânge. El nu reglează elementele în raport cu presiunea osmotică, ci în raport cu valorile absolute ale apei sau substanţelor disolvate. In cazul unei hipertonii iniţiale, sângele care vine în contact cu rinichiul are izotonia restabilită prin primul mecanism de reglare, conţine însă o cantitate de particule disolvate, de exemplu o sare introdusă intravenos sau un compus rezultat din metabolism în cantitate mai mare decât normal şi, în acelaş timp, o cantitate mai mare de apă, care a fost adusă din ţesutul conjunctiv. Aceste cantităţi depăşesc pragul de eliminare renală caracteristic lor şi vor fi eliminate prin rinichi; dacă eliminarea de substanţe disolvate şi de apă nu se face în proporţii anumite, pentru a nu modifica numărul de particule dintr'un volum dat are loc o modificare a presiunii osmotice din sânge, ca rezultat al acestei eliminări inegale. Deci rinichiul lucrează de fapt modificând izotonia. Ca reacţie imediată, ţesutul conjunctiv intervine fie cedând, fie fixând apa din sânge şi restabileşte din nou echilibrul. Acest sânge devenit izotonic conţine însă din nou un exces sau deficit de substanţe disolvate şi apă în raport cu valorile lor normale; rinichiul elimină din nou acest exces care depăşeşte pragul de eliminare, izotonia e din nou modificată şi „mecanismul de reglare imediată" intervine din nou, apoi iar rinichiul, şi aşa mai departe, până ce valorile absolute ale substanţei disolvate în sânge şi ale apei au redevenit normale. Deci, ambele mecanisme intervin în reglarea permanentă a izotoniei şi sunt la fel de necesare pentru menţinerea ei în limite constante.

In cazul unei creşteri a cantităţii de substanţe disolvate în sânge are loc un aport imediat de apă din ţesuturi, care măreşte astfel cantitatea de sânge ce vine în contact cu rinichiul şi, deci, eliminarea de substanţe prin rinichi e favorizată. In cazul unui insuficient aport de apă din ţesuturi, printr'un mecanism pur fiziologic, prin senzaţia de sete, se recurge la apă din afară, pentru a realiza acest proces.

Fenomenele biologice care rezultă din modificările locale ale presiunii osmotice sunt mai evidente în două cazuri speciale, dintre care unul a fost observat la plante — *turgescenţa*.

Planta, care nu are un sistem de susţinere, se menţine dreaptă şi umflată cu apă (acesta e fenomenul turgescenţei); când apa dispare, planta se vestejeşte. Turgescenţa se explică prin pătrunderea apei prin osmoză în interiorul plantei, care conţine sucuri cu presiune osmotică mai mare; planta funcţionează ca un osmometru. O plantă pusă în apă se vestejeşte, apa din ţesuturi ieşind în afară pentru a dilua soluţia înconjurătoare. E interesant că fenomenul turgescenţei intervine în creşterea normală a plantei. S'a observat că, în regiunile unde turgescenţa e mai intensă, şi proliferarea celulară e intensă. Turgescenţa prepară creşterea, umflând ţesuturile unde, ulterior, prin multiplicare celulară, se realizează sistemele de susţinere.

Deasemenea, *secreţia glandelor* se poate explica printr'un fenomen de desechilibru osmotic. O glandă se poate considera ca un organ care ia unele elemente din mediul intern şi, după ce le transformă în diverse chipuri, le elimină în alt mediu. O schemă osmotică a unei glande pentru

Scanned with OKEN Scanner

a explica secreţia ar fi următoarea : un tub care la un capăt are o membrană permeabilă pentru apă şi anumite substanţe. Acestea trec în interiorul glandei, sunt transformate într'o substanţă X, pentru care membrana de intrare nu e permeabilă, iar membrana dela celălalt capăt al tubului e permeabilă. Dacă se introduce în apă capătul de intrare *A*, apa pătrunde din afară în interior, datorită presiunii osmotice exercitate de moleculele *X* (turgescenţă), are loc o creştere de volum şi eliminare în afară a excesului de apă cu substanţa *X* pentru care membrana de ieşire *D* e permeabilă.

Se poate face o experienţă de acest gen cu un cartof, din care am scos o mică porţiune. Se introduce în gaură o bucăţică de zahăr, zahărul se disolvă, soluţia concentrată atrage apă prin peretele celular şi cavitatea se umple cu apă, care se revarsă în afară.

S'a observat că organele în general şi glandele în special sunt foarte sensibile la variaţiile presiunii osmotice. Ochiul este organul cel mai sensibil şi la nivelul lui s'ar găsi chiar nervi speciali, sensibili la variaţiile presiunii osmotice.

Se poate face o experienţă în care se pune în evidenţă influenţa presiunii osmotice asupra secreţiei glicogenului din ficat, în felul următor : se izolează ficatul unui animal viu, perfuzat prin vasele sale, prevăzute cu un rezervor de soluţie izotonică. Dacă se pune ficatul într'un vas cu ulei de vaselină, prevăzut cu un nivel capilar, se vede o deplasare a indexului din tubul capilar ori de câte ori ficatul suferă o variaţie de volum. Lichidul perfuzat fiind uşor hipotonic, ficatul se umflă prin osmoză, iar în vasele aferente se constată produsul său de secreţie, glicogenul. Ficatul mort nu reacţionează la fel.

Plămânul, la fel, e sensibil la variaţii de presiune osmotică : îşi măreşte volumul în soluţii hipotonice şi se retractă în soluţii hipertonice.

Rinichiul se comportă invers, se umflă în prezenţa soluţiilor hipertonice şi se desumflă în soluţii hipotonice. Rinichiul realizează astfel un travaliu contraosmotic, deoarece face un transport de substanţe dela locurile cu concentraţie mai mică ($\Delta = -0{,}56^{c}$) spre urină, care are o presiune osmotică mare ($\Delta = -1{,}30 - 2{,}20°$). Se ştie că, în osmoza normală, transportul se face dela locurile cu concentraţie mai mare spre locurile de concentraţie mai mică. Rinichiul lucrează ca o pompă care ar transporta un gaz dela o presiune mai mică într'un rezervor aflat sub presiune mai mare. Acest lucru cere un travaliu de compresiune, întocmai cum se întâmplă când vrem să transportăm o substanţă dintr'o soluţie mai diluată într'o soluţie mai concentrată. Rinichiul realizează astfel un travaliu contraosmotic care a fost evaluat la 425 kg/m, aproape o calorie. Acest travaliu se face pe seama energiei eliberate în procesele de ardere intense care se petrec în rinichi.

FENOMENE CLINICE ALE INSUFICIENŢEI OSMOTICE

Variaţiile presiunii osmotice nu au consecinţe grave atâta timp cât ele nu depăşesc valoarea corespunzătoare unei scăderi a punctului de congelare $\Delta = -0{,}70°$, valoare numită valoare critică. Peste aceasta apar accidente nervoase grave, crize epileptiforme.

Extirparea rinichiului la iepure produce în 5—6 ore o hipertonie corespunzătoare unui $\Delta = -0{,}72°$. La om, din cauza intervenţiei primului

mecanism de reglare prin țesutul conjunctiv, hipertonia apare abia după 3—4 zile.

Valori crescute ale lui Δ apar în afecțiunile renale, precum și unele cazuri de diabet insipid. Ele apar mai ales în anurie. Valori scăzute ale presiunii osmotice se găsesc în caşexii și în graviditate.

Valoarea presiunii osmotice în probele de urină, recoltate prin cateterism, ne indică dacă un rinichi e sănătos sau nu. O probă clinică, care să indice capacitatea rinichiului de a restabili presiunea osmotică a sângelui, este proba de concentrare și de diluție a lui Volhard.

Un rinichi sănătos are atât capacitatea de a concentra, cât și de a dilua urina; el are o zonă de acomodare anumită care, în cazuri patologice, e modificată.

Dacă în urinile pentru care în proba de diluție valoarea densității este de 1001—1002, iar în aceea a concentrării 1030, se determină și scăderea punctului de congelare, se constată în primul caz valori scăzute și, în al doilea, crescute (— 0,088°, — 3,5°), deci și valoarea lui Δ ne poate indica dacă un rinichi e sănătos sau nu. Dacă se recoltează separat prin cateterism urinile din cei doi rinichi și se determină Δ, se poate cunoaște care din rinichi nu funcționează. Volhard atribue următoarea semnificație probei lui: 1) dacă rinichiul elimină repede apa, sau are capacitatea de a concentra, adică să elimine substanțe solide, independent de diluare — e sănătos; 2) dacă ambele probe sunt modificate, cauza este insuficiența renală. Dacă menținerea densității e bună, dar eliminarea e proastă, are loc o deranjare extrarenală a echilibrului apei în organism. O concentrare proastă și o eliminare de apă bună poate fi și ea datorită unei cauze extrarenale.

★

Necesitatea păstrării izotoniei sanguine impune din punct de vedere practic anumite precauții: atunci când se practică injecțiile intravenoase trebue evitată producerea de hipertonii și hipotonii. Substanțele medicamentoase introduse în circulația sanguină trebue administrate în soluție izotonică (de exemplu, soluție ClNa 9 $/_{00}$) și în genere în soluții fiziologic echilibrate. In clinică, valorile cele mai crescute ale lui Δ sanguin se găsesc în bolile renale, în eclampsie, în apoplexie. Valori subnormale se găsesc în genere în sarcini. Importanța presiunii osmotice pentru celule a dus la determinarea în clinică a *„rezistenței globulare"*, care măsoară capacitatea globulului roșu de a echilibra variațiile exterioare ale presiunii osmotice. In cazul icterului hemolitic, rezistența globulară e mult scăzută, în cazul icterului prin obstrucție această valoare e crescută, fapt care servește ca metodă de diagnostic diferențial.

IZOIONIA SÂNGELUI

Este condiționată de suma tuturor ionilor liberi care se află în sânge, precum și de proporțiile relative ale acestor ioni. Suma tuturor ionilor poate fi determinată experimental prin metoda conductibilității electrice, aceasta fiind proporțională cu numărul ionilor din sistem.

63% din valoarea conductibilității e dată de ClNa și restul de 37% de ceilalți ioni.

MECANISMUL DE REGLARE A ECHILIBRULUI ACIDO-BAZIC

Este un fapt bine cunoscut că, pentru menținerea în organism a unei stări compatibile cu viața, reacția lichidului interior trebue să fie slab alcalină și că o deviere mai mare dela limitele fiziologice este dezastruoasă pentru organism. O scădere a pH-ului la valori sub 7 poate duce la moarte prin comă acidozică, o creștere a pH-ului la valori peste 7,9 poate duce la moarte prin fenomene tetanice.

Menținerea în limitele normale a pH-ului sanguin este deci de extremă importanță. Variațiile normale, fiziologice, ale pH-ului sanguin sunt extrem de mici și, chiar în cazuri patologice, pH-ul este constanta biologică care suferă cel mai tardiv modificări. pH-ul sanguin variază între 7,30 — 7,45 la temperatura organismului și între sângele arterial și venos nu există decât diferențe mici (0,02 unități), sângele venos fiind ceva mai acid decât cel arterial.

Tabelul 35

Distribuția oarecum aproximativă a unora din ionii din plasma sanguină ar fi următoarea:

Ionul	Concentrație în miliechivalenți la 1 000 cc plasmă
Na	154
K	5
Ca	5
Mg	3
Cl	106
HCO_3	28

Dintre ionii a căror constanță este extrem de importantă, ionii H^+ ocupă primul loc.

Cauzele fiziologice care tind la modificarea pH-ului sanguin

Fixitatea phH-ului sanguin este surprinzătoare chiar în condițiile fiziologice normale, deoarece însăși viața fiziologică normală a organismului produce continuu acizi și baze care ar putea să-i modifice valoarea. De exemplu: arderile substanțelor organice din alimentație (glucide, lipide, protide) duc la formare de acid carbonic; arderea sulfoproteidelor duce la formare de acid sulfuric, a fosfoproteidelor de acid fosforic. Efortul muscular duce la formare de acid lactic. Alimentația vegetală aduce săruri formate din baze alcaline și acizi organici care, arși, produc acid carbonic și ioni bazici. In organism, apoi, sângele vine în contact cu alte sisteme mai acide, cum ar fi sucul gastric sau mai alcaline, ca sucul duodenal. Deci, în cursul proceselor fiziologice normale există continuu cauze care ar putea modifica pH-ul sanguin și totuși acest lucru nu se întâmplă. Nimic nu e mai constant în aceste condiții decât pH-ul sanguin. Dar chiar în cazuri patologice, când deversarea de acizi este exagerată (în diabet de exemplu, acizi cetonici), organismul reușește mult timp să-și mențină pH-ul sanguin. Acest lucru își găsește explicația în faptul că organismul posedă un mecanism reglator de mare finețe și precizie, care preîntâmpină orice acțiune ce ar putea să modifice echilibrul acido-bazic din sânge.

Reglarea echilibrului acido-bazic din sânge pune în joc nu un singur mecanism, ci o serie de mecanisme complexe și conjugate între ele. Factorii care intervin în menținerea neutralității fiziologice sunt *factori chimici* și *factori funcționali* care colaborează între ei și care, pentru ușurința studiului lor, se vor expune separat în două grupe, stabilind, atunci când va fi nevoie, corelația dintre ele.

Cele două grupe mari de mecanisme de reglare a echilibrului acido-bazic sunt:

1. *mecanismele de reglare fizico-chimică* și

2. *mecanismele de reglare fiziologică*, cu ajutorul organelor de eliminare.

1. *Mecanismele de reglare fizico-chimică* se petrec chiar *în sânge* şi *funcţionează imediat*, deoarece se petrec între ioni şi *automat*, atunci când apar cauze care tind să modifice echilibrul acido-bazic normal. La această reglare iau parte *sistemele tampon din plasmă şi globule* şi schimbul dintre *anionii din plasmă şi globule*.

2. *In mecanismele de reglare fiziologică* intervin *diversele organe* care elimină în afara organismului elementele care ar putea modifica echilibrul normal acido-bazic din sânge. Aceste organe sunt *plămânul şi rinichiul* şi, în mai mică măsură, *intestinul*.

Intre primele mecanisme de reglare, acelea fizico-chimice şi celelalte, fiziologice, există o *corelaţie de acţiune*, acestea din urmă *având de fapt rolul de a restabili şi menţine* sistemele tampon care la rândul lor menţin invariabil pH-ul sanguin.

Vom studia în detaliu fiecare din aceste mecanisme în parte.

Mecanismele fizico-chimice de reglare a echilibrului acido-bazic

Sângele ca sistem tampon. In reglarea pH-ului sanguin intervin imediat şi automat mecanisme de natură pur fizico-chimică, datorită cărora sângele poate funcţiona ca un sistem tampon, sistem care se opune deci modificării pH-ului său.

O experienţă simplă de laborator poate pune în evidenţă puterea de tamponare a sângelui, respectiv a plasmei sanguine. In două eprubete notate 1 şi 1′ se pun câte 2 cc plasmă şi 8 cc apă. In alte două eprubete notate 2 şi 2′ se pun câte 10 cc apă distilată. Se adaugă în toate patru eprubetele câte 5 picături de *roşu de fenol* [zone de viraj între pH 6,8 (galben) — 8,4 (roşu)].

Tuburile 1 şi 1′ au o nuanţă mai spre oranj decât tuburile 2 şi 2′, deoarece plasma e mai alcalină decât apa distilată. Se adaugă însă apei câteva picături de alcali pentru a o aduce la identitate de culoare. Se adaugă în tuburile 1 şi 2 câte 5 picături de HCl n/100. Nu se constată nicio schimbare de culoare în tubul 1 în raport cu 1′ (tuburile care conţin plasma), pe când tubul 2 devine net *galben* în raport cu 2′. Tubul 1 se comportă deci ca un mediu *tamponant* şi aceasta datorită plasmei pe care o conţine şi care menţine pH-ul invariabil în sistem. Tubul 2, neconţinând plasmă, nu funcţionează ca un mediu tamponant şi, la adăugarea de acid, şi-a modificat culoarea, deci pH-ul. Pentru a realiza acelaş pH ca în apa distilată trebue să adăugăm serului sanguin de 40—70 de ori mai mult NaOH şi de 327 de ori mai mult de HCl.

Experienţe făcute in vivo au arătat deasemenea capacitatea de tamponare a sângelui. Injecţii cu alcali în circulaţia sanguină a unui cobai în cantităţi care, în soluţie apoasă, ar fi trebuit să ridice pH-ul la 12, arată iniţial o ridicare a pH-ului sanguin la 9,6 şi după 3 ore o revenire la pH-ul 7,6, iar după 24 de ore la valoarea normală de 7,3.

Injecţii cu HCl în cantităţi care în soluţie apoasă ar corespunde la pH = 2 scad pH-ul dela 7,3 la 5,6; după 3 ore se ridică la 6,8, iar după 24 de ore revine la normal. Aceste experienţe realizate in vivo evidenţiază deasemenea capacitatea de tamponare a sângelui. Ea e datorită diverselor sisteme tampon conţinute în sânge. Le vom analiza pe rând în cele ce urmează.

Scanned with OKEN Scanner

Sângele se poate socoti, în mod destul de schematic, ca un sistem difazic format din plasmă și globule (în interiorul fiecăreia din aceste faze există însă alte diverse faze, de exemplu sistemele coloidale, disolvantul, etc.). In acest sens se pot analiza separat *sistemele tampon din plasmă* și din globule; aceste sisteme tampon pot lucra separat, dar *modificările care au loc într'una din faze au repercusiuni și asupra celeilalte.*

In reglarea pH-ului sanguin există astfel: factori de reglare *micști*, *globulari* și *plasmatici*, aceștia din urmă datoriți schimbului de anioni care are loc între plasmă și globule. *Sistemele tampon din sânge sunt în număr de 5.*

a) *Sistemele tampon din plasmă* sunt următoarele:

1. Sistemul bicarbonat/acid carbonic: în raportul: $\frac{20}{1}$ — $\frac{HBCO_3}{H_2CO_3} = \frac{20}{1}$

2. Sistemul fosfat bibazic/fosfat monobazic: în raportul: $\frac{5}{1}$ — $\frac{HB_2PO_4}{H_2BPO_4} = \frac{5}{1}$

3. Sistemul proteinat alcalin/proteinat acid: $\frac{\text{Proteinat B}}{\text{Proteinat A}}$

b) *Sistemele tampon din globule*

1. Bicarbonat/acid carbonic: $\frac{HB\,CO_3}{H_2\,CO_3}$

2. Fosfat bibazic/fosfat monobazic: $\frac{HB_2\,PO_4}{H_2B\;PO_4}$

3. Hemoglobinat alcalin/hemoglobină acidă: $\frac{BHb}{H.Hb}$

4. Oxihemoglobinat alcalin/oxihemoglobină acidă: $\frac{B\,HbO_2}{H\,HbO_2}$

B este o bază alcalină de Na sau K, și anume în plasmă în special Na, în globule în special K, deoarece se crede că membrana eritrocitului e permeabilă pentru K, dar nu pentru Na, fapt care și-ar găsi explicația în aceea că ionul de Na e învelit cu o pătură de molecule de apă, în așa fel că viteza și capacitatea lui de pătrundere sunt infinit mai mici. Aceleași cauze ar fi datorită impermeabilitatea mușchiului pentru Na și permeabilitatea pentru K.

c) *Factorul mixt globular și plasmatic* lucrează prin aceleași sisteme tampon, dar dirijate de schimbul de anioni care are loc între plasmă și globule, conform unui echilibru care se crede că este de tipul echilibrului de membrană Donnan.

Eficacitatea sistemelor tampon

Se știe că *maximul de eficacitate* al unui tampon e realizat atunci când pH-ul pe care trebue să-l mențină într'un sistem este egal sau aproape de pK-ul său [logaritmul cu semn schimbat al constantei de disociere a

acidului (sau bazei slabe) care intră în structura tamponului]. Sistemele tampon din sânge îndeplinesc în destul de mare măsură acest lucru.

Astfel, acidul carbonic din sistemul tampon bicarbonat/acid carbonic are : pK = 6,5

Fosfatul monobazic din sistemul fosfat bibazic/fosfat monobazic are : pK = 6,8

Hemoglobina acidă din sistemul hemoglobinat/HbH are : pK = 7,30

Oxihemoglobina acidă din sitemul oxihemobloginat/HbO_2H are : pK = 7,16

Diversele tampoane din sânge își exercită în mod adițional efectul; însumarea lor poate constitui un tampon „universal", extins într'o zonă largă de acțiune. Capacitatea de tamponare a fiecăruia din aceste sisteme în parte depinde însă și de concentrația acestora în sânge, precum și de ușurința de a fixa sau ceda alcalii sau acizii lor proprii, atunci când acizi sau alcali străini apar în circulația sanguină. De exemplu, sistemul fosfat, deși are un pH atât de apropiat de pH-ul sângelui, e însă puțin important fiind în concentrație mică în sânge, iar unul din motivele care fac din sistemul *tampon bicarbonat/acid carbonic* un tampon important este printre altele și faptul că acidul carbonic poate fi eliminat cu extremă ușurință pe cale pulmonară. Cele mai importante sisteme tampon din sânge sunt următoarele : sistemul bicarbonat/acid carbonic, sistemul hemoglobinat/hemoglobină acidă, oxihemoglobinat/oxihemoglobină acidă; mai puțin importante sunt : sistemul fosfat bibazic/fosfat monobazic și sistemul proteinat alcalin/proteinat acid. Vom analiza fiecare sistem tampon în parte, dar înainte de aceasta e necesar a aminti unul din sistemele de echilibru care intervine și în reglarea echilibrului acido-bazic, și anume echilibrul de membrană (Donnan).

Echilibrul Donnan

Echilibrul Donnan este un echilibru de tip special care se stabilește la limita între două faze separate printr'o membrană, atunci când într'una din faze există un ion pentru care membrana de separație este impermeabilă.

Repartiția ionilor între celulele și lichidele înconjurătoare (globule roșii/plasmă de exemplu), între celulele și lichidele interstițiale, între celule între ele, între lichide între ele (sânge/limfă ; sânge/lichid cefalorahidian, de exemplu) și chiar între organe întregi, este o problemă de mare importanță în fiziologie, deoarece ionii condiționează proprietățile fizico-chimice ale coloizilor care intră în structura materiei vii. Schimbul dintre aceste diverse sisteme se face la nivelul membranelor de contact.

Problema care se pune este aceea a repartiției ionilor prin aceste membrane. Dacă membrana este permeabilă pentru toți ionii din sistem și pentru disolvantul lor, chiar dacă inițial există inegalitate de concentrație a ionilor sau ioni diferiți de o parte și de alta a membranei, după un interval anumit se atinge o stare de echilibru caracterizată prin egalitatea de concentrație a ionilor, conform legilor difuziunii și osmozei.

Donnan (1911), studiind cazul special în care unul din ionii electrolitului care este de o parte a membranei nu este difuzibil prin membrana de separație, găsește la stabilirea echilibrului o inegalitate de concentrație de o parte și de alta a membranei, chiar a ionilor difuzibili prin această membrană. In aceste condiții, deci, se realizează la echilibru o stare specială de inegalitate de repartiție a ionilor difuzibili, inegalitate creată de prezența în sistem a unui ion nedifuzibil și care constitue așa numitul echilibru de membrană Donnan.

In genere, acest caz este realizat când într'unul din sistemele separate printr'o membrană se află un electrolit coloidal, un coloid de tip hidrofil, disociabil în doi ioni, unul din ioni fiind coloidal, mare și nedifuzibil, el poate fi un anion sau un cation. Acesta este cazul în celula vie, unde ionul coloidal este în general de natură proteinică.

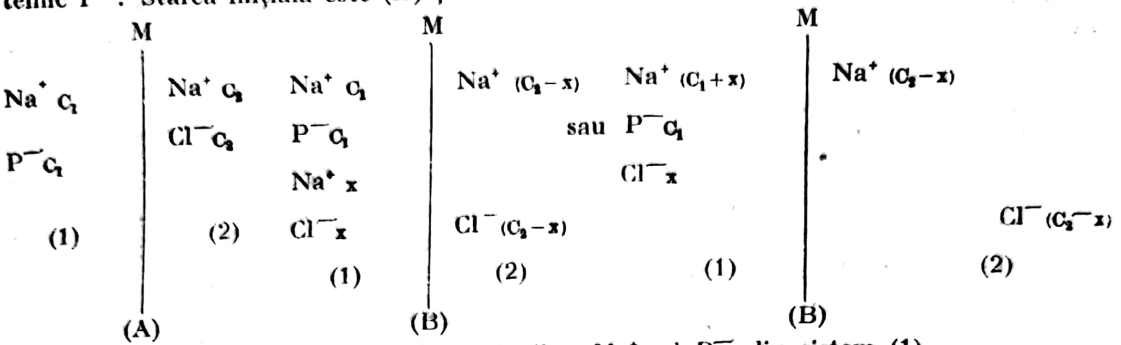
Relația matematică care poate indica repartiția ionilor difuzibili din sistem în cazul acesta special al prezenței unui ion nedifuzibil se poate deduce pe baza unui raționament

termodinamic, bazat pe legea conservării energiei sau pe teoria cinetică şi pe bază de consideraţii electrostatice (Wilson).

Vom da interpretarea cinetică şi electrostatică a fenomenului.

Fie două sisteme (1) şi (2) separate printr'o membrană *M*. In sistemul (1) se găseşte un coloid electrolitic, un proteinat de sodiu P—Na, în sistemul (2) ClNa (formată din ioni difuzibili Cl — şi Na+).

Membrana este permeabilă pentru ionii Cl⁻ şi Na+ şi impermeabilă pentru ionul proteinic P^-. Starea iniţială este (*A*) şi starea finală este (*B*).



în care C_1 este concentraţia iniţială a ionilor Na^+ şi P^- din sistem (1)
C_2 „ „ „ „ „ „ Na^+ şi Cl^- din sistem (2)
x „ „ ionilor difuzibili Na^+ şi Cl^- care trec din sistemul (2) în (1) atunci când se stabileşte echilibrul.

In starea iniţială (*A*), ionii Na^+ şi Cl^-, fiind difuzibili, vor trece din (2) în (1) într'o concentraţie egală cu *n*, iar la echilibru, concentraţia ionilor (Na^+) şi respectiv (Cl^-) va fi în (2) egală cu ($C_2 n$), iar în (1) ionul Na^+ va fi în concentraţia iniţială C_1 plus x, concentraţia ionilor Na^+ care au difuzat. Din cauza acţiunilor electrostatice exercitate de ionul *P* (nedifuzibil), ionul Na+ din sistemul (1) nu poate difuza şi din aceeaşi cauză odată cu ionul Na+ din compartimentul (2) trebue să difuzeze în aceeaşi concentraţie x şi ionul Cl^-, astfel că în compartimentul (2) la echilibru concentraţia ionilor Na^+ şi Cl^- va fi $(C_2 - x)$, iar în compartimentul (1) sodiul va fi în concentraţia $(C_1 + x)$ şi ionul Cl^- în concentraţia x deci, datorită prezenţei ionului nedifuzibil P de o parte şi de alta a membranei, se instalează la echilibru o stare de inegală repartiţie a ionilor difuzibili din sistem. Calculul concentraţiilor ionilor difuzibili de o parte şi de alta a membranei după instalarea echilibrului se poate face pe baza teoriei cinetice a materiei. Ionii Na^+ şi Cl^- din sistemul (2) pot difuza, dar nu pot trece prin membrană decât împreună, deoarece separarea lor ar crea forţe electrostatice puternice care s'ar opune difuziunii. Deci, pentru ca un ion Na^+ să poată trece, trebue să se întâlnească pe membrană cu ionul Cl^-, ambii ioni să atingă în acelaş timp membrana. Ionii având însă mişcări în toate direcţiile, probabilitatea ca un ion Na^+ şi un ion Cl^- să atingă în acelaş timp membrana va fi cu atât mai mare cu cât concentraţia lor va fi mai mare. Rezultă că trecerea ionilor Na^+ şi Cl^- prin membrană creşte proporţional cu concentraţia lor.

Frecvenţa ciocnirilor dintre cei doi ioni, conform calculului probabilităţilor, va fi proporţională cu produsul concentraţiilor celor doi ioni, adică (Na^+) $C_2 x$ (Cl^-) C_2.

La echilibru, difuziunea nu încetează din cauza mişcărilor moleculare, conform teoriei cinetice a materiei şi tot atâtea cupluri de ioni Na^+ şi Cl^- câte trec într'o parte vor trece şi în cealaltă — adică frecvenţa ciocnirilor de o parte şi de alta a membranei e egală între ele

$$(Na^+)\, c_1 + x \times (Cl^-)_x = (Na^+)\, c_2 - x \times (Cl^-)\, c_2 - x$$

$$\text{sau } \frac{(Na^+)\, c_1 + x}{(Na^+)\, c_2 - x} = \frac{(Cl^-)\, c_2 - x}{(Cl^-)\, x} \quad \text{I}$$

Deoarece legea electroneutralităţii cere ca $[Na^+]\, c_2 - x = [Cl^-]\, c_2 - x$ şi cum $[Na^+]c_1 + x$ neutralizează şi $[Cl^-]\, x$ şi $[P^-]$, urmează că $[Na^+]\, c_1 + x > [Na^+]\, c_2 - x$ şi $[Cl^-]\, x < [Cl^-]\, c_2 - x$ deci inegalitate de repartiţie de o parte şi de alta a membranei a ionilor difuzibili Na^+ şi Cl^- provocată de prezenţa ionului mare coloidal nedifuzibil. La echilibru avem deci :

$$Na^+ \;|\; > \;|\; Na^+$$
$$P^- \;|\;$$
$$Cl^- \;|\; < \;|\; Cl^-$$

Inegala repartiţie va fi în funcţie de concentraţia iniţială a electrolitelor şi de raportul concentraţiilor lor.

Prezenţa ionului nedifuzibil într'un sistem atrage prin membrană electiv ionii difuzibili de semn electric contrar şi respinge ionii difuzibili de acelaş semn electric, ca şi cum membrana ar fi permeabilă numai pentru unul din ioni şi nu pentru celălalt, pentru care în alte condiţii este permeabilă. Prezenţa unui ion nedifuzibil în sistem poate da astfel o imagine greşită asupra absorbţiei şi difuziunii selective prin membrane. Este

probabil ca absorbţia selectivă a K^+ la plante să fie datorită unui asemenea fenomen. Existenţa acestui echilibru de tip special, creat de prezenţa unui ion nedifuzibil la limita de separaţie dintre diversele faze, explică o serie întreagă de fenomene fizico-chimice şi biologice. Astfel se explică hidroliza sărurilor sub acţiunea membranelor, fenomenul de imbibiţie coloidală. Inegalitatea de concentraţie a ionilor difuzibili de o parte şi de alta a unei membrane explică existenţa potenţialelor electrice la limita de separare — aşa numitele potenţiale de membrană dirijate de relaţia Nernst.

$$E = R\ I \log \frac{C_1}{C_2}$$

unde C_1 şi C_2 sunt concentraţiile anionului şi cationului.

Existenţa unui echilibru Donnan a fost verificată într'o serie de sisteme biologice, deoarece aci există o separaţie a acestor sisteme prin membrane permeabile pentru ioni anorganici (mici), dar impermeabile pentru ionul proteinic coloidal (mare), realizând condiţiile pentru instalarea unui echilibru Donnan. Calculul concentraţiilor anionilor şi cationilor în diversele sisteme: globul roşu/plasmă, sânge lichid cefalorahidian, sânge/limfă tisulară, sânge/lichid de edem, etc. indică o inegală repartiţie de o parte şi de alta a membranei de separaţie a ionilor difuzibili. Dacă particula coloidală este un cation, va atrage în partea unde se găsesc anionii şi va respinge cationii difuzibili. Vom avea în acest caz un exces de anioni în partea care conţine cationul coloidal şi invers, în cazul unui anion coloidal, un exces de cationi difuzibili.

Vom expune în detaliu aplicarea echilibrului Donnan în cazul sistemului globulului roşu/plasmă sanguină, deoarece existenţa acestui echilibru explică acţiunea de tamponare secundară pe care o exercită hemoglobina în menţinerea echilibrului acido-bazic în sânge. Cercetări mai vechi au arătat că între globulul roşu şi plasma sanguină există o inegalitate de repartiţie a ionilor Cl^- şi HCO_3^-, deşi membrana de separaţie între globul şi plasmă este permeabilă pentru aceşti anioni.

S'a căutat ulterior să se explice această inegală repartiţie a ionilor difuzibili care contrazice legile osmozei şi difuziunii, ea fiind datorită unui echilibru Donnan la contactul dintre globule şi plasmă.

In acest sistem există într'adevăr condiţiile teoretice necesare ca un echilibru Donnan să se poată realiza, şi anume:

1. Diferenţa mare de concentraţie între proteinele din globul (30%) faţă de proteinele din plasmă (8%) creează o situaţie analoagă aceleia în care numai în unul din sisteme există un ion nedifuzibil, ion care la pH-ul sanguin e în special sub formă de anion (hemoglobina în globulul roşu).

2. Există ioni difuzibili prin pătura de separaţie dintre globule şi plasmă, şi anume, în cantităţi apreciabile anionii Cl^-, CO_3H^- şi cationul H^+ ceilalţi anioni difuzibili SO_4^{--}. HPO_4^{--} sunt în cantităţi neglijabile.

Membrana globulului roşu este aproape impermeabilă pentru cationii K^+ şi Na^+ (primul se află cu predominanţă în globulul roşu, celălalt în plasmă).

Avem astfel schematic

Hb^-	$Prot^-$	Membrana globulului roşu nefiind permeabilă pentru ionii Hb^-, Pr^-,
K^+	Na^+	Na^+, K^+, repartiţia ionilor difuzibili Cl^-, H^+, HCO_3^- conform echilibru-
H^+	H^+	lui Donnan trebue să fie dată de relaţiile:
Cl^-	Cl^-	(H^+) globule $\times$ (H^+) plasma $=$ (Cl^-) globule $\times$ (Cl^-) plasmă
HCO_3	HCO_3	(H^+) globule $\times$ (H^+) plasma $=$ (HCO_3^-) globule $\times$ (HCO_3^-) plasmă
(1)	(2)	
Globulul roşu	Plasma	

$$\text{sau } \frac{(H^+)\ gl.}{(H^+)\ pl.} = \frac{(Cl^-)\ gl.}{(Cl^-)\ pl.} \text{ şi } \frac{(H^+)\ gl.}{(H^+)\ pl.} = \frac{(HCO_3^-)\ gl.}{(HCO_3^-)\ pl.}$$

$$\text{deci } \frac{(H^+)\ gl.}{(H^+)\ pl.} = \frac{(Cl^+)\ gl.}{(Cl^-)\ pl.} = \frac{(HCO_3^-)\ gl.}{(HCO_3^-)\ pl.} = K \text{ (constantă)}$$

Relaţia verificată experimental indică faptul că trebue înlocuite concentraţiile cu activităţile şi introdus un factor de corecţie.

$$\text{Relaţia: } \frac{(Cl^-)\ gl.}{(C^-)\ pl.} = \frac{(HCO_3^-)\ gl.}{(HCO_3^-)\ pl.} = K \text{ cerută de echilibrul Donnan.}$$

va putea explica o serie de observaţii constatate, şi anume: dacă tensiunea CO_2 în sânge creşte (de exemplu, atunci când sângele vine în contact cu ţesuturile), se constată o creştere

a bicarbonaţilor HCO_3^- în plasmă şi o creştere a ionilor (CL^-) în globulul roşu. Acest lucru se explică în felul următor : dacă tensiunea CO_2 din sânge creşte, globulul roşu va fixa mai mulţi bicarbonaţi alcalini, ceeace va duce la o creştere a raportului

$$\frac{(HCO_3^-)\ gl.}{(HCO_3^-)\ pl.}$$

Ca acest raport să nu se modifice aşa cum cere relaţia de mai sus, trebue să aibă loc o migrare a ionului HCO_3^- din globul în plasmă. Acest lucru va crea însă o inegalitate între anionii şi cationii din sistemele respective, ceeace e incompatibil cu legea electroneutralităţii ; pentru a corecta acest lucru are loc simultan o migrare inversă a ionului Cl^- din plasmă în globul, înlocuind aci ionul bicarbonic. Deoarece ionul Na+ din plasmă nu poate trece în globul (membrana acestuia fiind impermeabilă pentru Na+), acesta va neutraliza aci ionul bicarbonic HCO_3^- care trece din globul în plasmă şi îl va fixa în acest chip, îmbogăţind rezerva de bicarbonaţi alcalini. Prin aceasta, capacitatea de tamponare a plasmei pentru menţinerea echilibrului acido-bazic e crescută. Fenomenul se petrece invers când tensiunea CO_2 scade (adică atunci când are loc eliminarea în afară a CO_2 la nivelul plămânului). In acest caz are loc o creştere a HCO_3^- globular şi a Cl^- plasmatic.

Schimbul de anioni dintre globule şi plasmă este astfel corelat cu fenomenul respiraţiei şi explică faptele găsite anterior experimental, cunoscute sub numele de „tamponare secundară" a hemoglobinei, pe care o vom vedea la capitolul reglării echilibrului acido-bazic în sânge.

Datorită acestui schimb de anioni între globul şi plasmă şi ca o consecinţă a modificărilor de concentraţie a acestora are loc şi schimbul de apă între globul şi plasmă care a fost constatat în timpul respiraţiei. Sub acţiunea CO_2, are loc o creştere a volumului globulului roşu. Acest lucru este datorit unei migrări de apă din plasmă în globul prin următorul mecanism.

Datorită creşterii de CO_2 din sânge, cresc iniţial bicarbonaţii din globul şi secundar cei din plasmă (acesta din urmă numai cât e necesar pentru a menţine constant raportul

$$\frac{(HCO_3^-)\ gl.}{(HCO_3^-)\ pl.}$$

In acelaş timp migrează Cl^- din plasmă în globul. Deci în globul va exista o concentraţie ionică totală mai mare (aci a crescut atât Cl^-, cât şi HCO_3^-, ambele osmotic active) decât în plasmă, unde a crescut HCO_3^- osmotic activ, dar a scăzut Cl^-. Presiunea va fi mai mare în globul şi are drept consecinţă o migrare de apă din plasmă în globul şi deci o mărire de volum a acestuia. Fenomenul se petrece invers când tensiunea CO_2 scade (în urma eliminării CO_2 prin plămân).

Sistemele tampon

1. **Sistemul tampon bicarbonat alcalin/acid carbonic.** Acest sistem determină valoarea *pH-ului sângelui* şi în acelaş timp contribue la menţinerea lui, deşi capacitatea de tamponare este mai mică, de exemplu, decât a sistemului tampon *hemoglobină sau oxihemoglobină.* Acestea din urmă fiind amfolite, nu pot impune pH-ul unui sistem, dar menţin pH-ul sistemului în care se găsesc, anihilând acţiunile care l-ar putea modifica. *Toate sistemele de reglare a echilibrului acido-bazic din sânge, atât sistemele fizico-chimice pure, cât şi cele fiziologice, prin acţiunea organelor de eliminare, tind să menţină invariabil raportul dintre concentraţia bicarbonatului şi concentraţia acidului carbonic liber, deoarece valoarea numerică a pH-ului sanguin e în funcţie de valoarea acestui raport.* Acest lucru îl vom vedea din expunerea care urmează.

Sistemul tampon *bicarbonat/acid carbonic* aparţine sistemelor formate dintr'un acid slab şi sarea lui alcalină. Metalul din bicarbonaţi este în general, în plasmă, Na^+, iar în globul K^+. *Acestui tip de sisteme tampon i se aplică legea acţiunii masselor,* conform relaţiei :

$$(H^+) = K_{acid}\ \frac{\text{concentraţia acidului}}{\text{concentraţia bazei}}$$

Relaţia a fost aplicată de Henderson acidului carbonic şi sărurilor lui alcaline.

$$(H^+) = K_{acid}\ \frac{(CO_3H_2)}{(CO_3HB)},$$

unde K este constanta de disociere a acidului carbonic (CO_3H_2), iar Hasselbach exprimă con-

centrația ionilor de (H^+) în $pH = \log \frac{1}{(H^+)}$ $pH = - \log (H^+)$ și $pK = - \log K$. Relația devine:

$$pH = pK - \log [CO_3HB] - \log [CO_3H_2]$$

sau

$$pH = pK - \log \frac{(CO_3 HB)}{(CO_3 H_2)}$$

unde pH = log cu semn schimbat al concentrației de hidrogen și pK = log cu semn schimbat al constantei de disociere a acidului din sistem.

Ecuația este cunoscută sub numele de ecuația lui *Henderson-Hasselbach*.

Calculul pH-ului se poate face cu ajutorul acestei ecuații dacă cunoaștem valoarea *pK* CO_3H_2; $[CO_3HB]$ și $[CO_3H_2]$, deci dacă se cunoaște valoarea constantei de disociere a acidului carbonic, concentrația acidului carbonic și concentrația bicarbonatului din sistem.

Calculul valorii pK *a acidului carbonic.* Valoarea pK pentru CO_3H_2 nu se poate deduce din valoarea pe care o are constanta de disociere a *acidului carbonic în apă pură*, deoarece prezența altor sisteme disolvate o modifică. S'a constatat într'adevăr, că variază cu prezența bicarbonaților, a altor săruri ale hemoglobinei și în genere a tuturor celorlalți constituenți ai sângelui. Se constată că hemoglobina, de exemplu, scade valoarea constantei de disociere, a lui K. Deasemenea, la calcularea valorii concentrațiilor (CO_3HB) și (CO_3H_2) trebue luate în seamă nu concentrațiile determinate printr'un dozaj direct al CO_3HB și CO_3H_2, ci activitățile și deci trebue introduși coeficienții de activitate f (CO_3HB) și f (CO_3H_2).

S'a găsit pentru pK în sânge o valoare egală cu 6,18, dar e probabil că variază pentru fiecare sânge în parte. Formula Henderson-Hasselbach devine astfel: $pH = 6{,}18 - \log. \frac{(CO_3 HB)}{(CO_3 H_2)}$ și cu ajutorul ei se poate calcula pH-ul sângelui. S'a constatat că, în mod normal, valoarea raportului $\frac{(CO_3HB)}{(CO_3H_2)}$ în sânge este aproximativ $\frac{20}{1}$, ceeace ar corespunde unui pH, calculat cu formula de mai sus, între 7,42 — 7,35, deci apropiat de limitele fiziologice.

Păstrarea deci în aceste limite a pH-ului sanguin ar depinde de păstrarea în limitele normale a raportului: $\frac{\text{bicarbonat}}{\text{acid carbonic}}$ (deoarece pK e o constantă) și nu de valorile absolute ale componentelor acestui raport. *Toate sistemele de reglare a pH-ului sanguin, atât cele datorite diverselor sisteme tampon, precum și acelea datorite mecanismelor fiziologice, tind astfel să mențină intactă valoarea acestui raport.* Sistemul bicarbonat/acid carbonic, în afară de rolul de a determina valoarea pH-ului sanguin are și o capacitate de tamponare destul de mare, adică și de menținere a acestui pH (deși mai mică decât a Hb). In adevăr, Michaelis, lucrând in vitro cu soluții apoase care aveau aproximativ concentrația (CO_3HB)

și (CO_3H_2) ca în sânge constată că, adăugând acid, pH-ul sistemului nu se modifică decât în limite destul de mici. De exemplu: soluție de bicarbonat de sodiu 0,12 molar și de acid carbonic 0,01 molar are un pH = 7,62 dedus din relația *Henderson-Hasselbach.*

$$pH = pK \text{ acid carbonic} + \log. \frac{(CO_3HB)}{(CO_3H_2)}$$

$$(H^+) = K\ (CO_3H_2)\ \frac{(CO_3H_2)}{(CO_3NaH)} = 3.10^{-7}\ \frac{0,01}{0,12} = 0,25 \times 10^{-7}\ pH = 7,62$$

Dacă acestui sistem i se adaugă 0,01 mol acid carbonic, deci se dublează concentrația în acid carbonic, relația devine:

$$(H^+) = 3,10^{-7}\ \frac{0,02}{0,12} = 0,50 \times 10^{-7} \text{ și } pH = 7,301$$

deci modificare destul de mică a pH-ului. Dacă se adaugă chiar un acid tare, cum este ClH, în aceeași concentrație 0,01 mol, reacția este:

$$\frac{CO_3H\,Na\ (0,12\ mol) + ClH\ (0,01\ mol)}{CO_3\,Na\ (0,11\ mol) + 0,01\ mol\ CO_3H_2 - Cl\,Na}$$

(ClNa sare neutră, nu intervine),
deci (CO_3HNa) devine: 0,11 mol. (CO_3H_2): 0,02 mol. și relația $(H^-) = 3.10^{-7}\ \frac{0,02}{0,11} = 0,546 \times 10^{-7}$ pH = 7,263, deci variații foarte mici ale pH-ului.

Din această experiență reiese că sistemul acesta are și o capacitate mare de tamponare. Rolul ca sistem de tamponare datorit componentei acide CO_2 care poate fi eliminat cu ușurință este extrem de important în special în plasmă, unde se găsește în mare cantitate (2/3 în plasmă, în globule 1/3). In sângele total, menținerea constantă a raportului bicarbonat/acid carbonic nu este datorită numai capacității sale proprii de tamponare, ci în mare măsură celorlalte sisteme tampon și în special hemoglobinei și oxihemoglobinei din globulul roșu, deoarece acidul carbonic se formează aci din CO_2 și H_2O, după cum vom vedea, sub acțiunea catalitică a acid carbonicanhidrazei. Inainte de a cerceta celelalte sisteme este interesant să analizăm în detaliu componentele sistemului tampon bicarbonat/acid carbonic și origina lor în organism.

Componentele sistemului tampon bicarbonat/acid carbonic. Componentele acestui sistem tampon își au origina în CO_2 deversat de țesuturi în sânge și în alcalii din sânge.

Anhidrida carbonică CO_2 este produsul final al tuturor arderilor care se petrec în organism. Se formează 800—900 g zilnic și e continuu adus în sânge din țesuturi. Cantitatea de CO_2 pe care o reține sângele este însă în funcție de presiunea CO_2 din sânge, respectiv din conținutul în CO_2 al aerului alveolar cu care sângele arterial este în echilibru gazos. CO_2 din sânge are o presiune egală cu presiunea parțială a CO_2 în aerul alveolar. Cu cât presiunea CO_2 din aerul alveolar va fi mai mare, cu atât cantitatea de CO_2 reținută în sânge va fi mai mare. In condiții normale, aerul alveolar are un conținut de 5,5—5,9 volume CO_2 %, ceeace cores-

punde unei presiuni parţiale a CO_2 cuprinsă între 30—40 mm Hg la 38°. Această valoare este extraordinar de constantă la normali. Acestei presiuni îi corespunde în sânge o concentraţie totală de 45 volume % CO_2 pentru sângele arterial şi de 50—60 volume CO_2% pentru sângele venos.

In sângele venos sunt variaţii în limite mai mari, deoarece aici există o continuă deversare de CO_2 din ţesuturi, în raport cu activitatea acestora. Această activitate la rândul ei poate varia presiunea corespunzătoare (are valori între 45—50 mm Hg).

Formele de fixare a CO_2 (anhidridei carbonice) în sânge. CO_2 poate fi fixat în sânge 1) *sub formă liberă* şi 2) *sub formă combinată.*

α). CO_2 liber în sânge. Anhidrida carbonică CO_2 poate fi fixată în sânge sub formă liberă disolvată fizic, în raport cu coeficientul său de solubilitate, în apa din plasmă. Ştim că CO_2 disolvat în soluţie se găseşte sub formă de *acid carbonic*, CO_3H_2.

Solubilitatea CO_2 în plasmă este mică; coeficientul său de solubilitate (cantitatea de CO_2 disolvată într'un 1 cc plasmă la 0° şi 760 mm Hg) *este de 0,510.* Deci, pentru a calcula CO_2 disolvat la 1 cc plasmă la presiunea aerului alveolar, se face raportul $\frac{0{,}510 \times 30}{760}$; acesta este egal cu 0,02 cc la 1 cc plasmă (2 cc la 100 cc plasmă).

Din determinările de CO_2 total în plasmă se constată o valoare de 42%, deci un plus de 40 volume % care depăşeşte limita sa de solubilitate. Explicaţia ar fi că acest exces de CO_2 e fixat sub formă de compuşi, raportul dintre CO_2 *disolvat* fizic şi CO_2 *din compuşi* fiind de $\frac{40}{2} = \frac{20}{1}$ pentru o presiune de 30 mm Hg a aerului alveolar şi de 17,9 pentru o presiune de 39,9 mm Hg (2,7 volume % CO_2 liber la 48,3 volume % CO_2 combinat). Primului raport îi corespunde în relaţia Henderson-Hasselbach o valoare de pH = 7,42, celui de al doilea 7,35 deci, limitele fiziologice ale pH-ului.

β. CO_2 combinat. Se vede că CO_2 fixat în sânge se găseşte în majoritate sub formă de compuşi şi anume în special sub formă de *bicarbonaţi alcalini* şi în mai mică măsură sub forma unui compus cu *hemoglobină* numit carbohemoglobină. Din totalul de CO_2 care se eliberează din sânge în plămân, 10% provine din CO_2 disolvat fizic, 70% din bicarbonaţi, 20% din carbohemoglobină.

Origina bicarbonaţilor alcalini. Bicarbonaţii alcalini provin din acidul carbonic rezultat din anhidrida carbonică prin disolvare în apă şi care, pe măsură ce se disolvă, fixează radicalii alcalini puşi la dispoziţia acestui acid de către:

1. Sărurile alcaline ale acizilor mai slabi decât acidul carbonic (proteinaţi) care pot *fi descompuse de aceşti acizi* conform reacţiei: proteinat B + $CO\,H_2$ = CO_3HB + proteină H; pe scurt, radicali puşi la dispoziţie de celelalte sisteme tampon din sânge, fosfaţi, proteinaţi şi în special hemoglobinaţi, aceştia din urmă fiind în cantitate mai mare.

2. Din sărurile neutre ale acizilor (ClNa) care pun la dispoziţia acidului carbonic alcalii lor, dar nu printr'o simplă acţiune de descompunere a acestora de către acidul carbonic, ci printr'un mecanism mai complicat, datorit unui schimb de anioni care are loc între globule şi plasmă conform unui echilibru Donnan. Ambard admite chiar o acţiune directă

eficace a acidului carbonic asupra ClNa, dar numai în prezența proteinelor care fixează excesul de ClH format din descompunerea sărurilor. Formarea bicarbonaților nu este un proces chiar atât de simplu, el necesită o serie de transformări fizico-chimice ale CO_2 disolvat fizic și anume: 1) hidroliza CO_2 disolvat fizic conform reacției

$$\underset{\text{disolvat}}{CO_2} + H_2O \rightleftarrows CO_3H_2$$

și 2) disocierea în ion bicarbonic: $CO_3H_2 \rightleftarrows CO_3H^- + H^+$.

Acest ion bicarbonic se unește cu alcalii din sânge (CO_3H_2 la pH-ul sângelui nu disociază decât extrem de puțin în ioni carbonici CO_3^{--}, el nedisociind astfel în cantități apreciabile decât în condiții de pH>8).

Seria reacțiilor preliminare formării bicarbonaților este astfel:

$$CO_2 + H_2O \rightleftarrows CO_3H_2 \rightleftarrows CO_3H^- + H^+.$$

Reacțiile sunt reversibile și au loc în sânge în sens invers atunci când se face eliminarea CO_2 prin plămân.

Aceste reacții studiate in vitro prezintă o viteză de transformare extrem de mică, ce nu ar putea explica fixările și eliminările rapide care trebue să aibă loc în scurtul timp de contact al sângelui fie cu țesuturile când vine în circuit cu CO_2, fie cu alveolele pulmonare când pleacă în circuit cu CO_2 (aproximativ o secundă). Nu se putea explica această reacție de fixare a CO_2 sub formă de acid carbonic care la rândul lui să elibereze ionul bicarbonic, sau de cedare a CO_2 care are loc în organism, decât prin intervenția unei acțiuni catalitice. Intr'adevăr, Roughton și Meldum, Stadig și O'Brien au izolat din globulul roșu o enzimă pe care au numit-o *acid carbonicanhidraza*, și care accelerează mult aceste reacții. Astfel, accelerează capacitatea de fixare a gazului carbonic de 10 000 — 50 000 ori. Enzima se găsește numai în globulul roșu și nu în plasmă, astfel că modificările conținutului în CO_2 au loc primar în globulul roșu, iar modificările în plasmă au loc ulterior prin interschimbul cu globulul roșu. Acțiunea acestei enzime este inhibată de CNH, de CO, de un inhibitor din plasmă care s'a dovedit a fi o pseudoglobulină, de sulfamide, metale grele.

Fixarea CO_2 sub formă de bicarbonați nu este unica formă de fixare a lui în sânge, deoarece s'a constatat că, atunci când acțiunea diastazei este inhibată cu CNH și CO, sângele are totuși capacitatea de a fixa CO_2 în cantitate mult mai mare în raport cu coeficientul său de solubilitate. Se explică acest lucru prin formarea unui compus direct între CO_2 și hemoglobină, numit *carbohemoglobină*, și e probabil că are loc o combinare între acizii aminați din proteină și acidul carbonic, deoarece o serie de experiențe făcute cu soluții de amine, acizi aminați, polipeptide, arată o fixare rapidă a CO_2 în aceste soluții, cam de același ordin de mărime cu al soluțiilor de hemoglobină. Oxihemoglobina are o capacitate de combinare cu CO_2 mai mică decât hemoglobina. Vom vedea cum lucrează aceste sisteme și că acest fapt are importanță în transportul CO_2.

2. **Hemoglobina ca sistem tampon.** Am văzut că pH-ul sanguin e determinat de valoarea raportului bicarbonat/acid carbonic, conform ecuației Henderson-Hasselbach:

$$pH = pK - \log \frac{(H\,B\,CO_3)}{(H_2\,CO_3)}$$

și că deci fixarea ionului HCO_3^- sub forma de bicarbonat este extrem de importantă pentru a-l menține constant. Fixarea ionului HCO_3^- sub formă de bicarbonat se face grație alcalilor pe care diversele sisteme tampon, precum și sărurile metalelor alcaline (cu acizi mai puternici), le pun la dispoziția acestuia. Printre sistemele tampon, *cel mai important din acest punct de vedere este acela constituit din hemoglobină redusă și hemoglobină oxidată* (Hb și HbO_2).

Mecanismele prin care hemoglobina pune la dispoziția ionului bicarbonic HCO_3 alcalii necesari pentru a-l fixa în sânge sunt multiple și de mare precizie. Le vom analiza pe fiecare în parte.

Metoda utilizată pentru studiul fixării CO_2 în sânge, in vitro, constă în a urmări variațiile concentrațiilor CO_2 total (liber și combinat) și CO_2 liber (disolvat fizic). Supunând sângele la presiuni variabile de CO_2, concentrația acestuia în sânge va crește sau va scădea paralel cu presiunea (deoarece se știe că fixarea CO_2 în sânge este proporțională cu presiunea lui).

Pentru a putea lămuri rolul fiecărei componente din sânge în fixarea CO_2 și anume rolul hemoglobinei reduse, al hemoglobinei oxidate, al plasmei, al globulului, se va studia curba variațiilor CO_2 total, liber și fixat, separat în sângele redus, în sângele oxidat, în plasmă separată de globule și în globule separate de plasmă, fiecare din ele supuse la diferite presiuni de CO_2. Cu ajutorul acestei metode s'a putut preciza care este mecanismul real prin care Hb pune la dispoziție cu atâta ușurință și în cantitate atât de mare alcalii necesari sistemului tampon bicarbonat/acid carbonic, contribuind în atât de mare măsură la menținerea echilibrului acido-bazic din sânge.

a. *Rolul hemoglobinei ca sistem tampon prin mecanismul trecerii dela Hb la HbO_2. Curba de fixare a CO_2 în sângele total oxidat și redus.* Experiențe mai vechi au arătat că sângele supus in vitro acțiunii vidului elimină CO_2, atât liber, cât și combinat; la o presiune de o atmosferă nu mai conține deloc CO_2, alcalii din CO_2 combinat fiind fixați de proteine. Dacă un asemenea sânge e supus la presiuni crescânde de CO_2, se constată că acesta este fixat rapid. Dacă se dozează pentru fiecare presiune valoarea corespunzătoare a CO_2 total din sânge și cea a CO_2 disolvat fizic și se face un grafic al acestor valori, se obține pentru CO_2 disolvat fizic o dreaptă care crește foarte puțin cu creșterea presiunii CO_2, îndepărtându-se foarte puțin de axa absciselor, pe când pentru CO_2 total se obține o curbă care crește mult cu creșterea presiunii, desenând o hiperbolă caracteristică. Acest lucru arată că CO_2 fixat sub formă de bicarbonat crește mult cu creșterea presiunii, pe când creșterea cantitativă de CO_2 liber, disolvat fizic, este redusă și nu poate depăși limita de solubilitate a CO_2 în apa din sânge, care am văzut că este destul de mică. Aceste rezultate sunt date în graficul clasic al lui Christiansen, Douglas și Haldane, care au studiat acest fenomen în amănunțime (fig. 124).

Din studiul acestei curbe se constată un lucru extrem de interesant, și anume că, pe când variațiile CO_2 liber disolvat fizic sunt aceleași, atât pentru sângele venos, cât și arterial (dreapta foarte puțin depărtată de axa absciselor), curba CO_2 total este pentru sângele venos (deci pentru Hb redusă) mai ridicată decât pentru sângele arterial (deci pentru HbO_2). La o presiune de 40 mm Hg%, sângele arterial conține cam 48 cc CO_2 sub formă de bicarbonat; sângele venos conține mai mult, 58%. Acest lucru arată că, la presiuni egale, capacitatea de fixare a CO_2 e mai

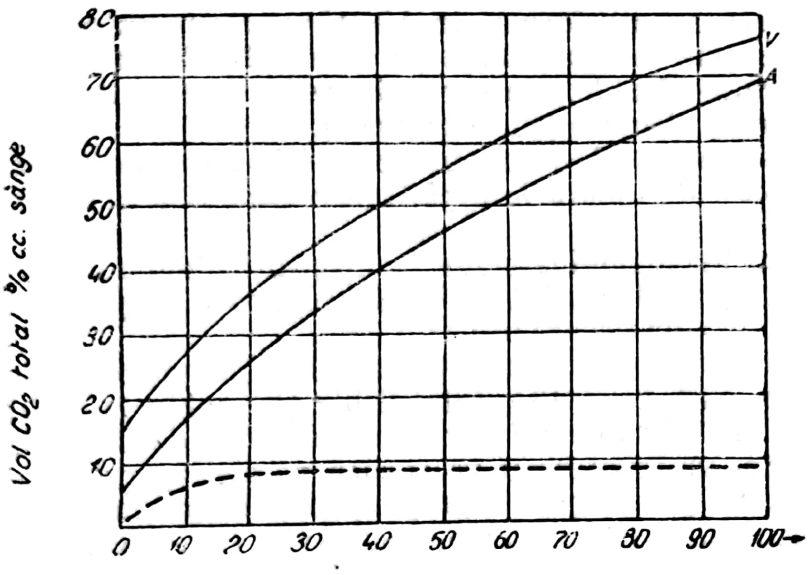


Fig. 124. Curba de fixare a CO_2 în sângele arterial şi cel venos.

mare pentru Hb redusă decât pentru HbO_2, adică Hb pune la dispoziţia CO_2 mai mulţi alcali decât HbO_2. Acest fapt constatat experimental îşi găseşte următoarea explicaţie fizico-chimică. Hb e un acid mai slab decât HbO_2, are $pK_{Hb}=7{,}30$, pe când $pK_{HbO_2}=7{,}15$ (adică Hb are o constantă de disociere mai mică decât HbO_2, deci e un acid mai slab ca acesta); deaceea hemoglobinaţii, formă sub care se găseşte Hb la pH-ul sanguin, vor fi mai uşor descompuşi de acidul carbonic a cărui constantă de disociere este mai mare decât a HbH. $pK_{(CO_3H_2)} = 7{,}19$ şi îi vor ceda mai uşor alcalii, pe când HbO_2, un acid mai puternic, va ceda mai greu alcalii din oxihemoglobinaţi, acidului carbonic. ($pK_{CO_3H_2}$ este între pK_{Hb} şi pK_{HbO_2}) şi deci fixarea CO_2 în sângele arterial (oxigenat) va fi mai mică decât în sângele venos. Această diferenţă de comportare a Hb şi HbO_2 în raport cu capacitatea lor de fixare a CO_2 capătă o importanţă extraordinară în organism. Trecerea dela HbO_2 la Hb e întovărăşită de o eliberare de alcali, deoarece HbO_2, fiind un acid mai puternic, avea fixaţi mai mulţi alcali decât poate fixa Hb. Această trecere se produce la nivelul ţesuturilor şi este simultană cu eliminarea CO_2 din ţesuturi în sânge. In momentul în care oxigenul este cedat ţesuturilor şi acestea deversează CO_2 în sânge, se eliberează o cantitate de alcali care poate neutraliza acest CO_2 transformându-l în bicarbonat alcalin. E deci o acţiune de tamponare. In felul acesta, trecerea dela Hb la HbO_2 face ca în sistem să fie un acid mai slab HbH, care acidifică mai puţin sângele decât HbO_2 (HbO_2H e un acid cam de 67 de ori mai puternic decât HbH).

Prin trecerea oxihemoglobinaţilor în hemoglobinaţi, 100 cc sânge eliberează la pH = 7,40 o cantitate de alcali care poate fixa 13 cc CO_2.

Deci, prin simpla trecere dela HbO_2 la Hb şi fără a consuma alcalii din sistemele tampon, sângele reuşeşte să-şi neutralizeze o mare parte din CO_2 deversat de ţesuturi, aşa fel ca pH-ul său să nu se modifice.

Intr'adevăr, am văzut că pH-ul depinde de valoarea raportului $\frac{(CO_3HB)}{(CO_3H_2)}$.

Or, în momentul în care CO_2 prin deversare, din ţesuturi, creşte şi capacitatea de a-l fixa sub formă de bicarbonat, datorită eliberării de alcali prin trecere dela HbO_2 la Hb, creşte deci atât numitorul, cât şi numărătorul.

Raportul $\frac{(CO_3HB)}{(CO_3H_2)}$ nu se modifică, deci nici pH-ul.

Invers, când la nivelul alveolelor pulmonare Hb trece în HbO_2, va avea loc o fixare de alcali din bicarbonaţi datorită faptului că HbO_2 fiind un acid mai puternic decât CO_3H_2, va scoate alcalii din sărurile acestuia.

Acest lucru ar duce la o scădere a cantităţii de bicarbonaţi din sânge şi creşterea CO_3H_2, iar raportul $\frac{(CO_3HB)}{(CO_3H_2)}$ ar trebui să scadă, şi odată cu el şi pH-ul. Acest lucru nu se întâmplă, deoarece oxigenarea sângelui venos la nivelul alveolelor pulmonare facilitează expulzarea CO_2. Acidul carbonic în exces e eliminat prin plămân şi astfel raportul CO_3HB/CO_3H_2, e menţinut, ambii termeni ai lui scăzând simultan. Graţie acestui mecanism, atunci când în organism, în condiţii fiziologice normale, intervin cauze care ar putea să acidifice sângele (cum e cazul deversării de CO_2 din ţesuturi în sânge) sau să-l alcalinizeze (ca în cazul expulzării de CO_2 prin plămân), raportul rămâne normal.

Cuplarea acestor mecanisme cu reacţia reversibilă $Hb \rightleftarrows HbO_2$, *adică cedarea oxigenului din* HbO_2 *ţesuturilor şi respectiv fixarea oxigenului din aer de către Hb la nivelul alveolelor pulmonare, duce la menţinerea neschimbată a pH-ului sanguin.* Printr'o colaborare a mecanismelor de reglare pur fizico-chimice (cum este trecerea dela un acid slab la un acid puternic şi invers, sau cum este capacitatea unui acid mai slab de a ceda alcalii unui acid mai puternic), cuplate cu un mecanism care în fond este tot pe bază pur fizico-chimică, dar prin realizare devine fiziologic şi anume eliminarea prin plămân a acidului carbonic, se menţine constant raportul $\frac{(CO_3HB)}{(CO_3H_2)}$ şi deci pH-ul sanguin, atunci când trecerea CO_2 din ţesuturi în sânge ar putea să-l acidifice sau când CO_2 din sânge eliminat prin plămân ameninţă să-l alcalinizeze. Prin acest mecanism, 85% din totalul de CO_2 produs în organism e eliminat fără să fi determinat între timp *vreo modificare a pH-ului sanguin şi fără să fi consumat propriu zis alcalii din sistemele tampon, numai prin simpla reacţie reversibilă* $Hb \rightleftarrows HbO_2$ *care eliberează şi fixează în mod automat alcalii.*

b. *Rolul hemoglobinei ca sistem tampon prin mecanismul schimbului de anioni dintre globule şi plasmă.* Rolul Hb în menţinerea echilibrului acido-bazic din sânge nu este epuizat de mecanismul reacţiei reversibile $Hb \rightleftarrows HbO_2$. Faptul că Hb pune cu uşurinţă la dispoziţia ionului HCO_3^- alcalii ei proprii din hemoglobinaţi (HbH fiind un acid mai slab decât CO_3H_2) şi că este în cantitate mult mai mare decât alte sisteme tampon, putând oferi deci mai mulţi alcali, face ca acest sistem, coroborat cu un alt mecanism fizico-chimic care face posibil schimbul de anioni dintre globul şi plasmă, să-şi răsfrângă acţiunea de tamponare şi dincolo de globulul roşu unde este inclus, şi anume, asupra plasmei. Pentru a lămuri mecanismul prin care îşi exercită acţiunea de tamponare asupra plasmei, se va determina curba de fixare a CO_2 separat în plasmă şi globule, şi anume : în *plasma „adevărată"*, în *plasmă „separată"*, în *globule „separate"* şi în *globule „adevărate"*.

Să definim fiecare din aceste noţiuni. Se înţelege sub *plasmă adevărată*, plasma care este supusă la diverse presiuni de CO_2 atâta timp cât mai este în contact cu globulele şi în care determinarea CO_2 total şi liber se face după separarea ei de globule (prin centrifugare sub o pătură de ulei de vaselină).

Se înțelege sub *plasmă separată*, plasma supusă acțiunii diverselor presiuni de CO_2 după ce a fost separată de globule (tot prin centrifugare).

Se înțelege prin *globule separate*, globulele roșii supuse acțiunii diverselor presiuni de CO_2, după separarea lor de plasmă.

Se înțelege prin *globule adevărate*, globulele roșii supuse la diverse presiuni de CO_2 în prezența plasmei și în care se determină CO_2 total și liber, după separarea de plasmă.

Rezultatele acestor variate experiențe au lămurit mecanismul de tamponare pe care îl exercita Hb și asupra plasmei, deși aceasta nu conține Hb. Rezultatele sunt date în fig. de mai jos.

Plasma „separată" și cea „adevărată", supuse la presiuni crescânde de CO_2, îl reține sub formă de bicarbonați și liber disolvat fizic. CO_2 total (combinat + liber) este în cantitate mult mai mare în plasma adevărată decât în plasma „separată". Pentru plasma separată se obține o curbă care crește puțin cu creșterea presiunii până la o anumită valoare a ei și apoi se desfășoară paralel cu axa absciselor. Cu o soluție apoasă care conține proteine sub formă de proteinați, în concentrație egală cu cea din plasmă (8—9%), se obține o curbă analoagă. Plasma „adevărată", deși conține aceeași cantitate de proteine, prezintă o curbă care crește mult cu creșterea presiunii, diferă deci de aceea a plasmei separate, și îmbracă un traiect hiperbolic care se aseamănă mult cu acela obținut în sângele total. Studiul globulelor roșii „separate" și al celor „adevărate" în aceleași condiții indică un fenomen invers. Globulele roșii „separate" dau tot o curbă ascendentă, deoarece conțin totuși mai mari cantități tampon decât plasma (30Hb% față de 8—9% proteine în plasmă) totuși, cu o înclinare mai mică decât aceea obținută cu globule roșii separate, cu sânge total sau cu plasmă adevărată. Pentru acidul carbonic liber disolvat fizic se obține în toate aceste cazuri o aceeași dreaptă puțin ascendentă care se depărtează foarte puțin de axa absciselor și care corespunde solubilității CO_2H_2 în apa din plasmă, globule, sânge total (fig. 125).

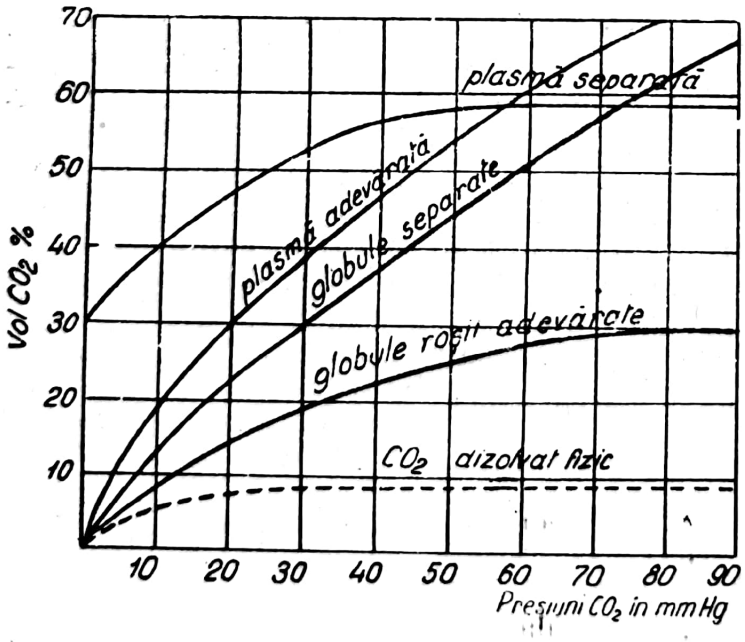


Fig. 125. Curba de fixare a CO_2 în plasmă adevărată, plasmă separată, globule adevărate și separate.

Explicația acestui fenomen ar fi următoarea.

Plasma „separată" este un mediu care conține o cantitate mică de sisteme tampon (proteine cam 8—9%; fosfați în foarte mică cantitate), deci ea poate pune la dispoziția CO_2 puțini alcali care să-l fixeze. Plasma nu poate fixa mai mult CO_2 decât alcalii pe care îi pot ceda sistemele tampon din plasmă. Faptul că plasma „adevărată" fixează mult mai mult CO_2 și dă o curbă analoagă aceleia obținute cu sângele total și cu globulele

roşii separate, arată că Hb din globulele roşii măreşte printr'un mecanism oarecare şi capacitatea de fixare a CO_2 în plasmă. Deasemenea, faptul că globulele roşii „adevărate" au o curbă de fixare cu o înclinare mai mică decât a globulelor roşii „separate" arată că, în contact cu plasma, globulele roşii îi cedează tamponi; creşte capacitatea de fixare a CO_2 în plasmă, iar globulele pierd în acelaş timp o parte din cantitatea de CO_2 fixat sub formă de bicarbonat. Prin ce mecanism se exercită acţiunea de tamponare a globulului roşu asupra plasmei? Există două posibilităţi:

1. *sau globulul roşu cedează plasmei alcali sub influenţa presiunii crescânde de* CO_2,

2. *sau globulul roşu cedează plasmei, după ce a fixat* CO_2, *ioni bicarbonici gata formaţi.*

Prima ipoteză (a lui Zunz) nu putea fi acceptată, deoarece se ştie că porţiunea protoplasmatică care separă globulul roşu de plasmă este impermeabilă pentru cationi (K din globul nu poate trece astfel în plasmă). Se ştie însă că această proteină protoplasmatică este permeabilă pentru anioni, deci pentru CO_3H^-. Globulul roşu putea aşa dar să lase să treacă în plasmă ionul CO_3H^- pe care îl conţinea în mai mare cantitate decât plasma, deoarece are, graţie Hb, o capacitate de fixare a CO_2 sub formă de bicarbonaţi mai mare decât aceasta. Problema care se punea era însă de unde va lua ionul CO_3H^- cedat plasmei alcalii. O observaţie veche a lui Gürber şi Koeppe (1899) şi studiul lui Hamburger lămuresc acest lucru; ei constată că, atunci când creşte presiunea CO_2 în sânge, se obţine simultan o creştere a clorului în globule şi o scădere a Cl din plasmă, deci are loc o trecere a ionului Cl din plasmă în globul. Concomitent se constată o scădere a ionului bicarbonic din globul şi o creştere a lui în plasmă; s'a petrecut de fapt un schimb de anioni, Cl^- şi bicarbonic, între plasmă şi globule; or, ionul Cl^-, care trece din plasmă în globule, provine din săruri alcaline şi în special din NaCl care e în cantitate mai mare; prin trecerea Cl în globule, aceşti alcali rămân la dispoziţia CO_3H^- care vine din globul şi găseşte radicalii alcalini lăsaţi de ionul Cl^-. Extinderea acţiunii de tamponare a globulului roşu, respectiv a Hb din globulul roşu, şi asupra plasmei se explică în felul următor:

Când se face saturarea sângelui total cu CO_2 la diverse presiuni, acesta e fixat de alcalii furnizaţi de diversele sisteme tampon din sânge (fosfaţi, proteine, Hb); cantitatea fixată în plasmă e mică, deoarece cantitatea de tamponi aflaţi aci, alţii decât bicarbonaţi, e mai mică decât aceea din globulul roşu.

Globulul roşu, graţie cantităţii mari de Hb (respectiv HbO_2) fixează mult mai mult CO_2 (sub forma de bicarbonat, cedându-i alcalii în cantităţi mari). Deci în globulul roşu este un exces de ioni CO_3H^- (pentru care globulul roşu este permeabil). Or, între anionii aflaţi de o parte şi de alta a unei membrane separatoare, permeabilă pentru ei, dar impermeabilă pentru ceilalţi ioni de care sunt fixaţi, trebue să existe un raport fix condiţionat de o anumită stare de echilibru, dat de echilibrul Donnan. Pentru a înţelege dece se face schimbul între anioni, precizăm aici că Donnan a demonstrat că distribuţia ionilor de o parte şi de alta a unei membrane, permeabilă pentru unii dintre ei, dar impermeabilă pentru ceilalţi, e condiţionată pentru ionii pentru care membrana este permeabilă de o anumită ecuaţie matematică între concentraţiile lor de o parte şi de alta a membranei.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru cazul nostru, distribuția ionilor de Cl^- și CO_3H^- între globul și plasmă trebue să respecte următoarea relație :

$$\frac{[CO_3H^-]\ gl.}{[CO_3H^-]\ pl.} = \frac{[Cl^-]\ gl.}{[Cl^-]\ pl.}$$

Or, atunci când crește presiunea CO_2, ionul (CO_3H^-) gl. crește în globulele roșii mai mult decât în plasmă (CO_3H^-) pl. și prin aceasta raportul devine :

$$\frac{[CO_3H^-]\ gl.}{[CO_3H^-]\ pl.} > \frac{[Cl^-]\ gl.}{[Cl^-]\ pl.}$$

Pentru a restabili egalitatea celor doi termeni trebue ca (CO_3H^-) din globul să treacă în plasmă. In acest caz însă ar fi exces de ioni (—) în plasmă, lucru pe care legea electroneutralității nu îl permite și atunci o egală cantitate de ioni Cl^- va migra în sens invers din plasmă în globul, părăsind radicalul alcalin care va fi fixat de CO_3H^-. In felul acesta, cantitatea de bicarbonat din plasmă crește odată cu presiunea CO_2, deși capacitatea plasmei de a fixa CO_2 e mică. Cum pe de o parte capacitatea de fixare a globulului roșu e mai mare decât a plasmei, iar pe de alta echilibrul la suprafața de contact dintre globulul roșu și plasmă cere o anumită repartiție a ionilor de o parte și de alta a membranei de separație, repartiție condiționată de echilibrul Donnan, Hb are o acțiune de tamponare și asupra plasmei. Fenomenul se petrece invers când are loc o scădere a presiunii de CO_2 : deoarece plasma conține mai mult bicarbonat decât globulul roșu (acesta din urmă are o capacitate mai mare de a fixa CO_2 sub formă de CO HB, dar nu îl păstrează decât temporar) pentru a menține relația $\frac{(CO_3^-H)\ gl.}{(CO_3H^-)\ pl.} = \frac{(Cl^-)\ gl.}{(Cl^-)\ pl.}$ trebue să trimită ioni CO_3H^- din plasmă în globul ; legea electroneutralității cere atunci ca globulul să elimine o cantitate corespunzătoare de ioni Cl^- care părăsesc în globul cationul, ce poate fixa CO_3H^-.

Deci, prin acest mecanism, când crește acidul carbonic din sânge datorită unui aport sporit de CO_2 dela țesuturi, crește cantitatea de bicarbonat prin cedarea alcalilor de către hemoglobină, iar în plasmă, prin schimbul de anioni dintre globule și plasmă, cresc ambii termeni ai raportului :

$$\frac{(CO_3HB)}{(CO_3H_2)}$$ pH-ul nu se va modifica.

Invers, când se produce o scădere a CO_2 din sânge, de exemplu în urma unei hiperventilații pulmonare, datorită schimbului de anioni în sens invers, ionul bicarbonic trece din plasmă în globul. Scade deci bicarbonatul plasmatic, ambii termeni ai raportului :

$\frac{(CO_3HB)}{(CO_3H_2)}$ scad, raportul e menținut neschimbat, deci pH-ul sanguin nu se va modifica. Și, lucru prețios în acest mecanism de tamponare, ca și în acela datorit reacției $Hb \rightleftarrows HbO_2$, nu se consumă rezerva de alcali din sistemele tampon, ci din sărurile neutre care nu funcționează ca sisteme tampon, și anume din sărurile acizilor puternici, NaCl în special (și în

mult mai mică măsură KCl, SO_4Na_2 şi SO_4K_2 sau săruri ale acidului fosforic). In felul acesta se face o economie de alcali din sistemele tampon, care sunt păstraţi pentru a fi puşi la dispoziţia acizilor străini şi, în general, a altor acizi decât acidul carbonic (lactic, fosforic, cetonici) care apar în circulaţia sanguină în condiţii fiziologice sau patologice.

Din descrierea acestor mecanisme de tamponare se vede că hemoglobina menajează rezerva de alcali din sistemele tampon, graţie capacităţii ei de a fixa sub formă redusă mai mulţi alcali decât sub formă oxidată şi datorită faptului că prin trecerea dela Hb la HbO_2 nu cedează propria ei rezervă, ci numai o parte ce se eliberează în orice caz în cursul oxigenării sângelui şi care s'ar pierde, dacă simultan cu eliberarea de alcali nu ar creşte cantitatea de CO_2 în sânge.

Graţie cantităţii ei mari în globul în raport cu cantitatea mică de proteine din plasmă (30% faţă de 8%), Hb fixează mult mai mult CO_2, punând la dispoziţia acestuia o cantitate mai mare de alcali. Prin aceasta produce un desechilibru între anionii din globule şi plasmă, desechilibru pe care legea lui Donnan şi legea electroneutralităţii nu îl admit; rezultatul este o migrare de ioni CO_3H^- din globule şi de ioni Cl^- din plasmă, cu părăsirea ionilor alcalini din cloruri în plasmă, unde stau la dispoziţia ionilor CO_3H^-. Aceştia nu au astfel nevoie să atace rezerva de alcali din celelalte sisteme tampon din plasmă (fosfaţi, proteine) şi în felul acesta deasemenea le menajează. Datorită acestor diverse mecanisme se explică dece sângele îşi datoreşte tamponarea în atât de mare măsură hemoglobinei; într'adevăr, capacitatea de tamponare a sângelui total variază cu concentraţia hemoglobinei.

In anemii, capacitatea de tamponare scade. Se obţin în acest caz curbe de fixare a CO_2 care se aseamănă cu acelea ale *plasmei separate* mai mult decât cu acelea obţinute pe sângele total.

Van Slyke, Hasting, şi alţi autori au calculat că pentru sângele oxigenat de cal 76% din tamponarea totală e datorită hemoglobinei şi 6,9% bicarbonaţilor; pentru sângele venos, 73,3% Hb, şi 9% bicarbonaţilor, iar restul, celorlalţi tamponi din sânge prin acţiunea de tamponare directă.

Mecanismul de tamponare realizat prin schimbul de anioni dintre globule şi plasmă pune problema permeabilităţii păturii limitante a globulului roşu pentru diverşii ioni. Incărcarea electrică, atât a membranei, cât şi a particulelor pentru care această membrană este permeabilă, joacă un rol fundamental. Experienţele de cataforeză a globulului roşu au arătat că la pH-ul organismului globulul roşu migrează spre polul pozitiv, deci are încărcare negativă, or faptul experimental arată că globulul roşu este impermeabil pentru cationi, particule de semn electric contrar, şi permeabil pentru anioni (Cl^-, CO_3H^-, etc.), particule cu acelaş semn electric şi care, logic, ar fi trebuit să fie respinse de aceasta. Mond a explicat acest fenomen în felul următor: într'adevăr, globulul roşu are în totalitatea lui o încărcare electrică negativă la pH-ul organismului, lucru care se explică prin aceea că în proteina limitantă sunt esteri ai grăsimilor cu acidul fosforic, lipoizi, care-şi conferă o încărcare negativă; există însă în această proteină limitantă şi alte faze, poate cu caracter proteinic, care, la pH-ul sângelui, se disociază ca o bază, astfel că există local o încărcare pozitivă. De exemplu, globina are punctul izoelectric 8,1, deci la pH-ul sângelui funcţionează ca o bază, are încărcare electrică pozitivă şi, în regiunile unde s'ar afla, ea ar putea să lase liberă trecerea

anionilor. Mond a arătat că dacă se reuşeşte prin alcalinizare să se inverseze semnul electric al globulului roşu, de exemplu la un pH 8,0—8,3, acesta devine permeabil pentru cationi şi impermeabil pentru anioni. Warburg admite că datorită echilibrului Donnan între globul şi plasmă se produce o modificare a potenţialului de membrană care poate duce la o modificare a semnului electric la nivelul suprafeţei de contact globul-plasmă. Pentru presiuni mari de CO_2, eritrocitele s'ar comporta ca şi cum ar fi încărcate pozitiv în raport cu plasma, pentru presiuni mici ca şi cum ar fi încărcate negativ. Acest lucru are importanţă în fenomenele de permeabilitate.

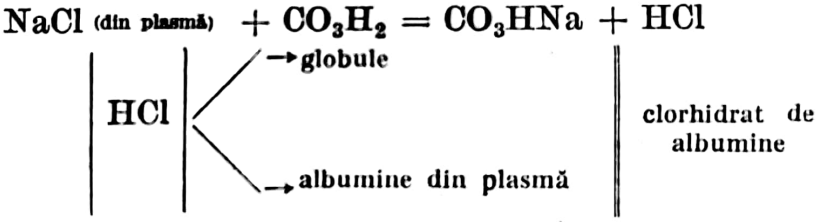
Schimbul de anioni se poate face între HCO_3^- şi alţi anioni decât Cl^-, de exemplu SO_4^{--}, HPO_4^{--}; aceştia din urmă sunt în cantităţi atât de mici încât nu au o semnificaţie mai importantă.

3. **Sărurile neutre în reglarea echilibrului acido-bazic.** Rolul lor este socotit de către Ambard şi colaboratorii lui fundamental în geneza bicarbonaţilor din sânge. După Ambard, alcalii necesari pentru fixarea acidului carbonic în plasmă ar fi puşi la îndemână nu atât de proteinaţi, cât de celelalte săruri neutre din sânge şi în special de NaCl din plasmă. Conform acestei concepţii, geneza bicarbonaţilor ar fi datorită reacţiilor.

I. NaCl (din plasmă) + CO_3H_2 = CO_3HNa + HCl
II. Proteinat de Na + CO_3H_2 = CO_3HNa + proteină.

Ambard socoate reacţia II secundară şi rolul proteinelor din plasmă şi globule ca fiind nu atât acela de a furniza alcali acidului carbonic, *ci acela de a fixa acidul clorhidric care se eliberează în cursul reacţiei I.*

Reacţia ar fi deci:



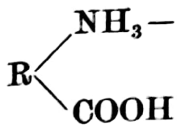
Ceeace se petrece cu NaCl se poate petrece şi cu alte săruri, SO_4Na_2, $PO_4H\,Na_2$, KCl, etc., dar NaCl, fiind în cantitate preponderentă în raport cu celelalte, se poate considera ca singura sare importantă.

Reacţia I între NaCl şi CO_3H_2, între o sare a unui acid puternic şi un acid slab, ar părea oarecum neverosimilă deoarece e greu de admis că un acid mai slab poate descompune în suficientă cantitate o sare a unui acid puternic. Astfel, reacţia I poate forma bicarbonat şi HCl, dar în cantitate extrem de mică, astfel că nu este importantă din punctul de vedere al genezei CO_3HNa; dacă pe măsură ce reacţia are loc HCl eliberat va fi înlăturat din reacţie, conform legii masselor, o nouă cantitate de NaCl va fi descompusă cu formare de CO_3HNa şi HCl şi, pe măsură ce HCl e înlăturat din sistem, pe aceeaşi măsură se va stimula formarea de CO_3 HNa. Or, în sânge, substanţele care îndepărtează HCl ar fi tocmai proteinele din plasmă şi globule care ar fixa HCl pe măsură ce se formează sub formă de acid-proteine, HCl-proteină.

Această concepţie diferă de aceea expusă înainte, după care ionul Cl care pătrundea în globul neutraliza bazele alcaline pe care proteinele le cedau bicarbonaţilor. După Ambard, HCl s'ar combina direct cu proteinele. Şi, astfel, plecând dela o reacţie aproape inexistentă care ar avea

loc între CO_3H_2 şi NaCl se poate obţine orice concentraţie de CO_3HNa, cu condiţia de a se sustrage din mediu HCl pe măsură ce se formează.

Albumina care sustrage HCl e însăşi albumina din sânge prin acizii aminaţi care formează compuşi de tipul



Existenţa HCl a putut fi pusă în evidenţă. Globulul roşu conţine 0,80 g HCl la 1000 cc globule. Invers, prin trecerea HCl din globulele roşii în plasmă, se realizează o descompunere a bicarbonaţilor.

După Ambard, concentraţia bicarbonaţilor în plasmă va depinde de trei factori : 1) concentraţia CO_3H_2, 2) concentraţia NaCl, 3) concentraţia proteinelor.

Cu cât concentraţia acestora va fi mai mare, cu atât cantitatea de bicarbonaţi va fi mai mare, şi anume :

1. Pentru o concentraţie constantă de NaCl, bicarbonaţii din plasmă cresc proporţional cu rădăcina pătrată a cantităţii de CO_3H_2.

2. Dacă CO_3H_2 e constant, bicarbonaţii din plasmă cresc proporţional cu NaCl (şi celelalte săruri), iar încărcarea în acid a proteinelor creşte fără a modifica pH-ul sistemului.

Deci poate avea loc o *supraîncărcare a proteinelor cu acid fără a modifica pH-ul din sistem* (*deoarece se formează bicarbonat în acelaş timp*). *Acest lucru e important, căci explică o serie de fenomene biologice observate sub acţiunea sărurilor, fenomene care nu modifică pH-ul.* De exemplu, prin simplu aport alimentar de NaCl se poate provoca o accelerare a ventilaţiei pulmonare fără modificare de pH. Lucrul se explică printr'o supraîncărcare cu HCl a centrilor nervoşi, care declanşează secundar o hiperventilaţie pulmonară. Teoria lui Ambard complectează şi explică o serie de fenomene, dar nu pe toate. Din cele de mai sus deducem importanţa acţiunii sărurilor neutre asupra încărcării acide a proteinelor tisulare şi în special a centrilor nervoşi care reglează ventilaţia pulmonară şi secundar valoarea bicarbonaţilor din raportul $\frac{CO_3HB}{CO_3H_2}$.

4. **Fosfaţii alcalini ca sistem tampon.** Există fosfaţi atât în plasmă, cât şi în globule, şi anume, sub formă de fosfat monosodic şi fosfat disodic în plasmă şi fosfat monopotasic şi dipotasic în globule. Deci, sisteme tampon de tipul acid slab/bază alcalină corespunzătoare $\frac{PO_4HB_2}{PO_4H_2B}$, în care PO_4HB_2 funcţionează ca bază alcalină, iar PO_4H_2B ca acid slab. Am văzut cum lucrează un asemenea sistem. Dacă se adaugă un acid mai puternic decât acidul PO_4H_2B, acesta va descompune sărurile lui alcaline PO_4HB_2 cu formare de sare neutră a acidului mai tare şi fosfat monobazic care, fiind un acid slab, va acidifica mult mai puţin mediul decât acidul puternic. In cazul unui aport de bază, aceasta va fixa fosfatul monobazic, care se va transforma în fosfat bibazic ; deci, în locul unei baze puternice, apare în sistem o sare care nu modifică pH-ul decât foarte puţin.

In primul caz reacţia este :

$$PO_4HB_2 + AH = PO_4H_2B + AB,$$

unde *A* e un radical acid mai puternic decât PO_4H_2 şi *B* o bază.

In al doilea caz:

$$PO_4H_2B + BOH = PO_4HB_2 + H_2O.$$

Deşi au un pK apropiat de pH-ul sângelui (PK = 6,8), rolul fosfaţilor ca sistem tampon în sânge nu este prea important, deoarece sunt în concentraţie foarte mică, mai ales în plasmă (9,5 mg pe cc plasmă). (Capacitatea de tamponare a unui sistem tampon e în funcţie şi de concentraţia lui). In globule, unde concentraţia lor e ceva mai mare, efectul lor tampon e mai marcat. Deasemenea, eficacitatea acestui sistem tampon este mai mică decât a sistemului bicarbonat, deoarece excreţia prin rinichi este relativ slabă şi deoarece împreună cu acidul se elimină şi componenta bazică.

Efectul tampon al fosfaţilor este important în urină. Cu ajutorul fosfaţilor alcalini care cedează acizilor mai puternici alcalii lor, rinichiul poate elimina acizii din sânge.

5. **Proteinele plasmatice ca sistem tampon**. Proteinele din plasma sanguină (globuline, serine), având ca orice proteine caracter amfolit, pot funcţiona ca sisteme tampon. La pH-ul slab alcalin al plasmei, proteinele, de exemplu globulinele şi serinele, funcţionează în special ca acizi, formând cu alcalii proteinaţi alcalini, fără însă ca funcţia lor bazică să fie complet neutralizată (pH-ul izoelectric al globulinei = 5,4 şi 6,2, al serinei = 4,7).

Aceste sisteme tampon funcţionează, am văzut, ca un amestec de acid slab şi sarea alcalină corespunzătoare, atunci când o invadare de alcali sau acizi tinde să modifice pH-ul mediului în care se află. In plasmă se găsesc în special proteinaţi de sodiu, în globule, proteinaţi de potasiu în echilibru cu proteina acidă.

Rolul tampon al proteinelor din plasmă nu este nici el atât de important deoarece concentraţia lor, deşi mare când este exprimată în grame (8%), exprimată aşa cum se obişnueşte pentru a avea date comparative, în molecule gram, având în vedere mărimea lor moleculară, este destul de mică. Proteinele din globulul roşu (Hb şi HbO_2) au un rol tampon atât de mare, după cum am văzut în capitolul trecut, nu numai graţie proprietăţii lor de a fi amfolite (cum este cazul pentru proteinele plasmatice), ci şi graţie altor mecanisme pe care le-am descris :

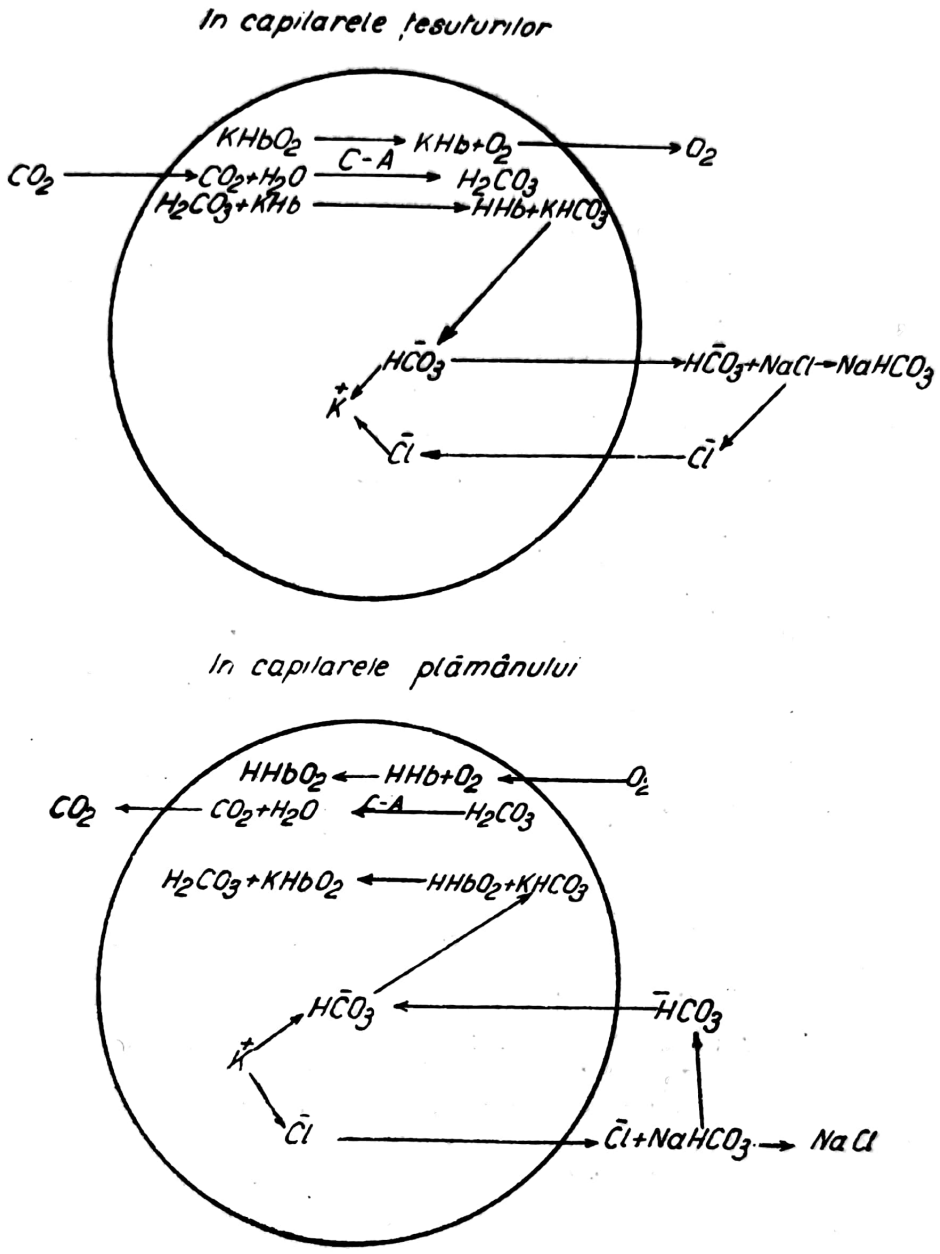
1) reacţia $Hb \rightleftarrows HbO_2$,

2) schimbul de anioni dintre globul şi plasmă.

In plasmă, tamponul cel mai eficace e dat de sistemul *bicarbonat/acid carbonic*. Am văzut, că, în afară de efectul tampon pe care îl execută în calitate de sistem format dintr'un acid slab şi sarea alcalină corespunzătoare, acest sistem are rolul important de a determina valoarea *pH-ului sanguin*. Acest sistem se găseşte în plasmă în mai mare cantitate decât în globule. Capacitatea lui de tamponare mare în organism este în mare măsură datorită faptului că radicalul acid al acestui tampon e un produs volatil care poate fi repede expulzat prin respiraţie.

Sistemul bicarbonat/acid carbonic, lucrează ca sistem tampon (eliberând alcalii) faţă de alţi acizi decât acidul carbonic, pe când celelalte sisteme tampon eliberează alcalii lor acidului carbonic. Oricare ar fi efectul tampon al diverselor sisteme din sânge, el este aditiv. La orice valoare a pH-ului, fiecare neutralizează o fracţiune din acidul sau alcalii care invadează sângele, contribuind astfel la menţinerea raportului invariabil $\frac{(CO_3HB)}{(CO_3H_2)}$ deci la menţinerea unui pH sanguin invariabil (fig. 126).

Intre globulele roşii şi plasmă:



In plasmă :
Acid fixat (HA) + $NaHCO_3$ → NaA + H_2CO_3
Acid fixat + Na_2HPO_4 → NaA + NaH_2PO_4
Acid fixat + Na — proteină → NaA + H — proteină
H_2CO_3 + Na_2HPO_4 → $NaHCO_3$ + NaH_2PO_4
H_2CO_3 + Na-proteină → $NaHCO_3$ + H — proteină

Fig. 126. Schemă ilustrând tampoanele sângelui.

Mecanismele fiziologice de reglare a echilibrului acido-bazic

In afară de reglarea pur fizico-chimică a pH-ului sanguin datorită acțiunii de tamponare a diverselor sisteme disolvate în sânge (Hb, săruri neutre, sisteme tampon propriu zise), intervine un alt tip de reglare datorit diverselor organe, acestea influențând însă, în ultimă analiză, tot sistemele de reglare fizico-chimică din sânge.

Organele care intervin în reglarea echilibrului acido-bazic din sânge sunt plămânul, rinichiul şi, în mai mică măsură, intestinul.

1. **Rolul plămânului** este legat de acţiunea pe care o exercită fenomenul respiraţiei asupra raportului bicarbonat/acid carbonic din sânge. Respiraţia, în sensul cel mai larg, este procesul prin care oxigenul e adus din exterior ţesuturilor şi prin care CO_2 din ţesuturi e eliminat în afară; or, acesta din urmă, este o componentă a raportului bicarbonat/acid carbonic, deci variaţiile respiraţiei trebue să influenţeze valoarea pH-ului. S'a constatat într'adevăr că oxigenarea sângelui, *combinarea Hb cu oxigenul la nivelul alveolelor pulmonare, creşte capacitatea de expulzare a CO_2 din sânge.*

S'a constatat că la fiecare moleculă de O_2 fixată se elimină 0,5 molecule de CO_2; CO_2 adus din ţesuturi în sânge nu va reuşi astfel să modifice raportul : $\frac{(CO_3HB)}{(CO_3H_2)}$, şi deci pH-ul sanguin, decât pentru o extrem de scurtă durată, dacă oxigenarea este destul de intensă şi dacă eliminarea CO_2 e destul de rapidă. Eliminarea CO_2 trebue să fie suficient de rapidă pentru ca modificările pH-ului să fie de extrem de scurtă durată; *or, eliminarea CO_2 e în funcţie de amplitudinea şi frecvenţa mişcărilor respiratorii*, iar amplitudinea şi frecvenţa mişcărilor respiratorii depind de acţiunea centrilor nervoşi, *în special de centrul respirator bulbar.* Acest centru respirator este la rândul lui extrem de sensibil la mici variaţii de pH sau CO_2 (nu s'au putut preciza exact care anume din ei), în aşa fel că el intensifică amplitudinea şi frecvenţa respiraţiei atunci când în sânge există modificări ale pH-ului.

Sensibilitatea centrului respirator bulbar faţă de variaţii extrem de mici ale pH este atât de mare, încât Henderson consideră ionii de H^+ (sau CO_2) ca jucând rolul unui „hormon respirator, un hormon desigur de tip special, care îşi reglează singur propriile sale variaţii. pH-ul sanguin reflectă în fiecare moment activitatea funcţiei respiratorii, constituind un indicator al stării acestei funcţii, şi invers, activitatea respiratorie este un indicator al echilibrului acido-bazic din sânge.

Când prin aport de acizi (de exemplu, acid lactic ca rezultat al efortului muscular sau acizi cetonici în cazul unui metabolism defectuos al glucidelor) are loc descompunerea bicarbonaţilor din sistemul tampon bicarbonat/acid carbonic şi se ajunge temporar la o creştere a acidului carbonic care ar putea modifica pH-ul, centrul respirator bulbar (sub acţiunea specifică a CO_2, sau a concentraţiei crescute a ionilor de hidrogen) comandă imediat o hiperventilaţie pulmonară, ceeace duce la eliminarea excesului de CO_2 şi restabilirea raportului bicarbonat/acid carbonic la valoarea normală, deci la menţinerea pH-ului.

Dacă are loc aport de CO_2, acesta fixează alcalii din celelalte sisteme tampon decât sistemul bicarbonat/acid carbonic cu formare de bicarbonaţi şi se produce o alcalinizare, o modificare a pH-ului în sens contrar. Mişcările respiratorii sunt încetinite, eliminarea CO_2 adus din ţesuturi e mai lentă, aşa fel că la creşterea CO_2 a corespuns o creştere de bicarbonat; raportul nu se modifică, pH-ul nu se va modifica.

Deci, reglarea amplitudinii şi frecvenţei respiratorii, reglare dependentă de ionii H^+, menţine raportul bicarbonat/acid carbonic în limitele normale şi asigură astfel pH-ul sanguin valoarea normală.

Scanned with OKEN Scanner

2. **Rolul rinichiului.** Pe când acţiunea de reglare a pH-ului prin mecanisme fizico-chimice este aproape imediată, deoarece se realizează prin reacţii între ioni, iar aceea a plămânului este aproape simultană cu ea, intervenţia rinichiului ca organ de reglare este mai tardivă, mai lentă, dar definitivă. Pe când plămânul reglează în special conţinutul în acid carbonic al sângelui, graţie faptului că acesta e un acid volatil (plămânul elimină cam 850 g acid carbonic în 24 de ore), rinichiul reglează conţinutul celorlalţi acizi decât acidul carbonic din sânge şi conţinutul în baze (Na^+, K^+).

Rinichiul intervine în reglarea echilibrului acido-bazic prin trei mecanisme :

a. eliminarea acizilor din sânge sub formă de acizi liberi ;

b. eliminarea din sânge a fosfaţilor sub formă de fosfaţi monobazici ;

c. fabricarea amoniacului.

a. *Eliminarea din sânge a acizilor sub formă de acizi liberi* înlătură dintrodată cauza care ar putea acidifica sângele. De exemplu, acidul acetilacetic sau β-oxibutiric, produse intermediare ale metabolismului grăsimilor, nu pot fi arşi complect în organism în cazul unui metabolism defectuos al glucidelor (diabet) şi ajung ca atare în sânge, unde sunt neutralizaţi de alcalii din tamponi, deci scad concentraţia tamponilor din sânge, scad rezerva de radicali alcalini disponibili din sânge.

Rinichiul poate elimina însă aceşti acizi liberi şi fără a fi neutralizaţi sub formă de săruri ; ei părăsesc definitiv prin rinichi organismul, lăsând în sânge alcalii pe care i-au blocat temporar şi care vor putea fi din nou utilizaţi atunci când o nouă invazie de acizi în sânge va cere o neutralizare imediată. Rinichiul poate elimina o urină acidă, cu pH 4,8, atunci când e necesar a păstra bazele în organism. Pot fi eliminaţi ca *acizi liberi numai acei acizi care au o constantă de disociere mică*, un pK mai mare decât pH-ul urinar ; ceilalţi trebue eliminaţi cu o cantitate echivalentă de alcali (de exemplu, anionii acizilor puternici (HCl, SO_4H_2) trebue eliminaţi neutralizaţi cu radicalul alcalin).

b. *Eliminarea de fosfaţi monobazici din fosfaţii bibazici din sânge* duce la păstrarea în sânge a unui radical bazic pentru fiecare radical fosforic eliminat. Acest radical bazic va putea fi pus la dispoziţia acizilor care pătrund în circulaţia sanguină. S'a observat într'adevăr, că atunci când *cresc acizii în sânge, cresc fosfaţii în urină.* In sânge, fosfaţii bibazici sunt în cantitate mai mare decât fosfaţii monobazici (80% fosfaţi bibazici, 20% monobazici din cantitatea totală de fosfaţi). In urină, dimpotrivă, 40% fosfat bibazic, 60% monobazic. Deci rinichiul are capacitatea de a elimina fosfaţii bibazici sub formă de fosfaţi monobazici, şi deci permite păstrarea radicalului alcalin. Transformarea fosfaţilor bibazici în fosfaţi monobazici are loc la nivelul rinichiului, sângele reţinând radicalii bazici rezultaţi prin această transformare, care astfel pot fi puşi la dispoziţia altor acizi. Aceasta se realizează probabil prin reabsorbţia ionilor bazici din ultrafiltratul glomerular şi înlocuirea cu ioni de H^+ secretaţi în lumenul tubular. Ar avea loc reacţia $PO_4HNa_2 + H^+ \rightarrow PO_4H_2Na + Na^+$.

din sânge — din rinichi — în urină — în sânge

E probabil că această transformare se face sub acţiunea unei enzime, o *fosfatază.* Intr'adevăr, în rinichi există o fosfatază foarte activă.

c. *Proprietatea rinichiului de a secreta amoniac* este extrem de importantă pentru menținerea echilibrului acido-bazic din sânge. Grație capacității rinichiului de a sintetiza amoniac se pune la dispoziția acizilor care trebue eliminați prin urină, și care nu pot fi eliminați ca acizi liberi, având o constantă de disociere mare, radicalul bazic care să înlocuiască radicalii alcalini ce neutralizează acești acizi în sânge. Radicalii pot fi păstrați și utilizați din nou pentru neutralizarea imediată a altor cantități de acid care pătrund în circulația sanguină:

$$\underset{\text{din sânge}}{NaCl} + \underset{\text{din rinichi}}{NH_3} \rightarrow \underset{\text{în urină}}{NH_4Cl} + \underset{\text{în sânge}}{Na^+}$$

S'a constatat că în stările de acidoză crește cantitatea de amoniac eliminată în urină. Astfel, dozajul amoniacului urinar și titrarea acidității pot fi folosite ca indicator aproximativ al echilibrului acido-bazic din sânge. *Când bazele alcaline din sânge depășesc cantitatea normală*, parenchimul renal devine permeabil pentru bicarbonații în exces și îi elimină în urină care devine alcalină.

3. **Rolul intestinului** e mai puțin important ca al plămânului sau rinichiului. In general, se elimină pe cale intestinală bazele alcalino-pământoase (Ca și Mg), iar dintre acizi, acidul carbonic și fosforic, sub formă de carbonați, fosfați și acizi grași.

Pentru a fixa cele expuse asupra mecanismelor de reglare a echilibrului acido-bazic în sânge, vom prezenta în rezumat în cele ce urmează înlănțuirea reciprocă a tuturor acestor mecanisme.

Rezumăm deci întregul mecanism de reglare din organism.

Atunci când cauze fiziologice sau patologice duc la o acumulare de *acizi în sânge*, aceștia tind să modifice valoarea raportului $\frac{(CO_3HB)}{(CO_3H)}$, decid pH-ul sanguin, care știm că este dat de relația Henderson-Hasselbach $pH = pK - \log. \frac{(CO_3HB)}{(CO_3H_2)}$ unde $pK = 6{,}10$ pentru plasma sanguină.

1. Imediat și automat sângele, cu ajutorul *bicarbonaților și al proteinelor din plasmă*, al *hemoglobinei*, al *fosfaților* al *schimbului de anioni dintre globule și plasmă, furnizează acestor acizi alcalii necesari neutralizării lor*. Această acțiune nu este însă de durată și nici totdeauna suficientă.

2. Aproape concomitent însă *plămânul, printr'o ventilație exagerată, elimină acidul carbonic în exces* (acest acid apare în circulația sanguină adus de țesuturi sau din descompunerea bicarbonaților de către alți acizi). Aceste două mecanisme reușesc să aducă la normal temporar raportul: $\frac{(CO_3HB)}{(CO_3H)}$ din sânge.

3. Eliminarea celorlalți acizi se face prin *rinichi*, fie ca *acizi liberi, fie ca săruri amoniacale.*

Când pH-ul a redevenit normal se constată însă că nu totdeauna și valorile absolute ale bicarbonaților și ale acidului carbonic (CO_3HB) și (CO_3H_2) din sânge sunt cele normale. *Acest lucru înseamnă că sângele și-a menținut pH-ul, dar capacitatea lui de tamponare s'a schimbat.* Știm

că pH-ul unui tampon nu se modifică cu concentraţia, *dar capacitatea de tamponare scade odată cu aceasta.* Tendinţa organismului este de a păstra intactă capacitatea de tamponare şi acesta este rolul plămânului şi, în special, al rinichiului. Din determinarea concentraţiei absolute a valorii bicarbonaţilor din raportul $\frac{(CO_3HB)}{(CO_3H_2)}$ se poate deduce creşterea sau scăderea capacităţii de tamponare a sângelui.

Desechilibrul acido-bazic se manifestă nu numai prin modificarea pH-ului sanguin, ci şi prin scăderea capacităţii de tamponare. In primul caz desechilibrul e grav, dar în cel de al doilea el poate duce, atunci când capacitatea de tamponare e mult scăzută, la o modificare rapidă a pH-ului. Un organism a cărui capacitate de tamponare sanguină e mult scăzută nu va putea compensa tendinţele la acidificare sau alcalinizare şi acest lucru va duce la o modificare a pH-ului. In acest sens se disting două tipuri de desechilibru acido-bazic : desechilibru acido-bazic necompensat şi desechilibru acido-bazic compensat. Inainte de a expune acest lucru vom defini însă noţiunea de *rezervă alcalină.*

Rezerva alcalină

Noţiunea de rezervă alcalină ar trebui să cuprindă totalitatea alcalilor pe care sângele îi poate pune la dispoziţia acizilor care ajung în circulaţia sanguină şi care trebue să fie neutralizaţi pentru a nu modifica pH-ul. Totuşi, se înţelege în mod curent sub *rezerva alcalină* numai *cantitatea de bicarbonaţi alcalini din sânge,* respectiv alcalii puşi la dispoziţie de bicarbonaţii din sânge.

Experimental nu se determină bicarbonaţii ca atare, ci cantitatea de CO_2 din bicarbonaţi care fixează aceşti alcali. După Van Slyke şi Cullen se înţelege în clinică sub *rezervă alcalină, cantitatea de CO_2 în cc la 0° şi 760 mm Hg conţinută în 100 cc plasmă.* Pare curios că se înţeleg sub rezervă alcalină numai alcalii din bicarbonaţi şi nu şi din celelalte sisteme tampon, dar deoarece ştim că *valoarea bicarbonaţilor* alcalini (raportul bicarbonat/acid carbonic determină valoarea pH-ului sanguin) *este rezultanta colaborării tuturor sistemelor tampon din sânge precum şi a sistemelor de reglare cu ajutorul organelor,* şi că deci valoarea bicarbonaţilor din sânge este un indicator al tuturor mecanismelor de reglare din organism, această interpretare este îndreptăţită. In acest sens, determinarea bicarbonaţilor ne poate da o imagine asupra întregului sistem de apărare a echilibrului acido-bazic din organism.

Dacă valorile absolute ale acestui raport au fost restabilite şi cantitatea de CO_2 fixată sub formă de bicarbonat a redevenit normală în sânge, înseamnă că toate sistemele tampon şi-au restabilit valorile lor, că mecanismele de reglare fiziologică sunt nealterate şi că deci organismul este apt pentru a lupta din nou în condiţii bune împotriva cauzelor care ar putea să-i modifice pH-ul.

Valoarea absolută a bicarbonaţilor alcalini este în fiecare moment o rezultantă a activităţii tuturor sistemelor de reglare din sânge şi din organe şi, prin aceasta, un indicator al mijloacelor de apărare pe care organismul le are la îndemână pentru a lupta împotriva acţiunilor variate care tind să-i modifice echilibrul acido-bazic.

Scanned with OKEN Scanner

Formele de desechilibru acido-bazic din organism

Am văzut că pH-ul sanguin e dat de relația : $pH = pK - \log \frac{(CO_3HB)}{(CO_3H_2)}$.

Dacă valoarea raportului $\frac{(CO_3HB)}{(CO_3H_2)}$ scade, are loc o scădere a pH-ului, deci *acidoză*. Dacă valoarea lui crește, pH-ul crește, are loc *alcaloză*.

Aceasta înseamnă că cei doi termeni ai raportului nu variază în același sens sau variază inegal și că organismul nu a reușit să compenseze variațiile unei componente prin variația proporțională și în același sens a celeilalte, în așa fel ca raportul să nu se modifice. Există deci un *desechilibru acido-bazic, necompensat* de către organism, și anume va fi *acidoză* sau *alcaloză necompensată*, după cum pH-ul scade sau crește față de valoarea normală.

Dacă atunci când una din componente se modifică, organismul reușește să restabilească valoarea normală a raportului : $\frac{(CO_3HB)}{(CO_3H_2)}$, compensând-o cu ajutorul celorlalte sisteme tampon, al plămânului și rinichiului, printr'o variație în același sens a celeilalte componente, valoarea pH-ului nu se modifică, deși valorile absolute ale componentelor au variat.

In acest caz, sângele are o capacitate de tamponare scăzută și prezintă din punctul de vedere al concentrațiilor absolute ale componentelor un desechilibru acido-bazic. *Desechilibrul* acesta va fi însă *compensat* atâta timp cât nu duce la o modificare a pH-ului. Vom vorbi de o *acidoză compensată* când cantitatea de bicarbonat din plasmă e scăzută în raport cu valoarea normală și de o *alcaloză compensată* când cantitatea de bicarbonat din plasmă e crescută — în raport cu valoarea sa normală.

In rezumat, *acidoza și alcaloza necompensată* se caracterizează prin modificări ale pH-ului sub sau deasupra valorilor normale 7,30—7,45. In *acidoza și alcaloza necompensată*, pH-ul rămâne invariabil, dar se modifică valorile „absolute" ale concentrației bicarbonaților în raport cu concentrația acidului carbonic (raportul $\frac{(CO_3HB)}{(CO_3H_2)}$ rămânând normal : $\frac{20}{1}$).

Clasificarea acidozelor și alcalozelor

Peters și Van Slyke disting două tipuri clinice, și anume : „tipul metabolic", în care perturbarea primară este datorită raportului dintre alcali și alți acizi din sistem decât CO_3H_2, și tipul respirator, în care perturbarea primară afectează conținutul în CO_2 al sângelui.

După Haldane, dacă se ia în considerare raportul $\frac{(CO_3HB)}{(CO_3H)}$ în cadrul celor două grupe mari de alcaloze și acidoze „compensate" și „necompensate" sunt posibile următoarele patru alternative, după variația bicarbonatului în raport cu aceea a acidului carbonic :

1. acidoză negazoasă,
2. acidoză gazoasă,
3. alcaloză negazoasă și
4. alcaloză gazoasă.

Aceste acidoze și alcaloze pot fi la rândul lor compensate sau necompensate.

Scanned with OKEN Scanner

1. *Acidoza negazoasă* $\frac{(CO_3HB)}{(CO_3H_2)}$ (−) — scad bicarbonaţii — este produsă de o *scădere primară de bicarbonat* în raport cu acidul carbonic: este acidoză prin deficit de alcali. Se mai numeşte şi *acidoză fixă.*

2. *Acidoza gazoasă* $\frac{(CO_3HB)}{(CO_3H_2)}$ (+) — creşte acidul carbonic — este produsă de o *creştere primară de acid carbonic* în raport cu bicarbonaţii.

3. *Alcaloza negazoasă* $\frac{(CO_3HB)}{(CO_3H_2)}$ (+) — cresc bicarbonaţii — este produsă de o *creştere primară de bicarbonaţi,* se mai numeşte şi *alcaloză fixă.*

4. *Alcaloza gazoasă* $\frac{(CO_3HB)}{(CO_3H_2)}$ (−) — scade acidul carbonic — este produsă de o *scădere primară de acid carbonic, alcaloză prin deficit de acizi.*

Vom analiza fiecare din aceste tipuri de acidoză şi alcaloză în parte, luând în considerare stările patologice corespunzătoare.

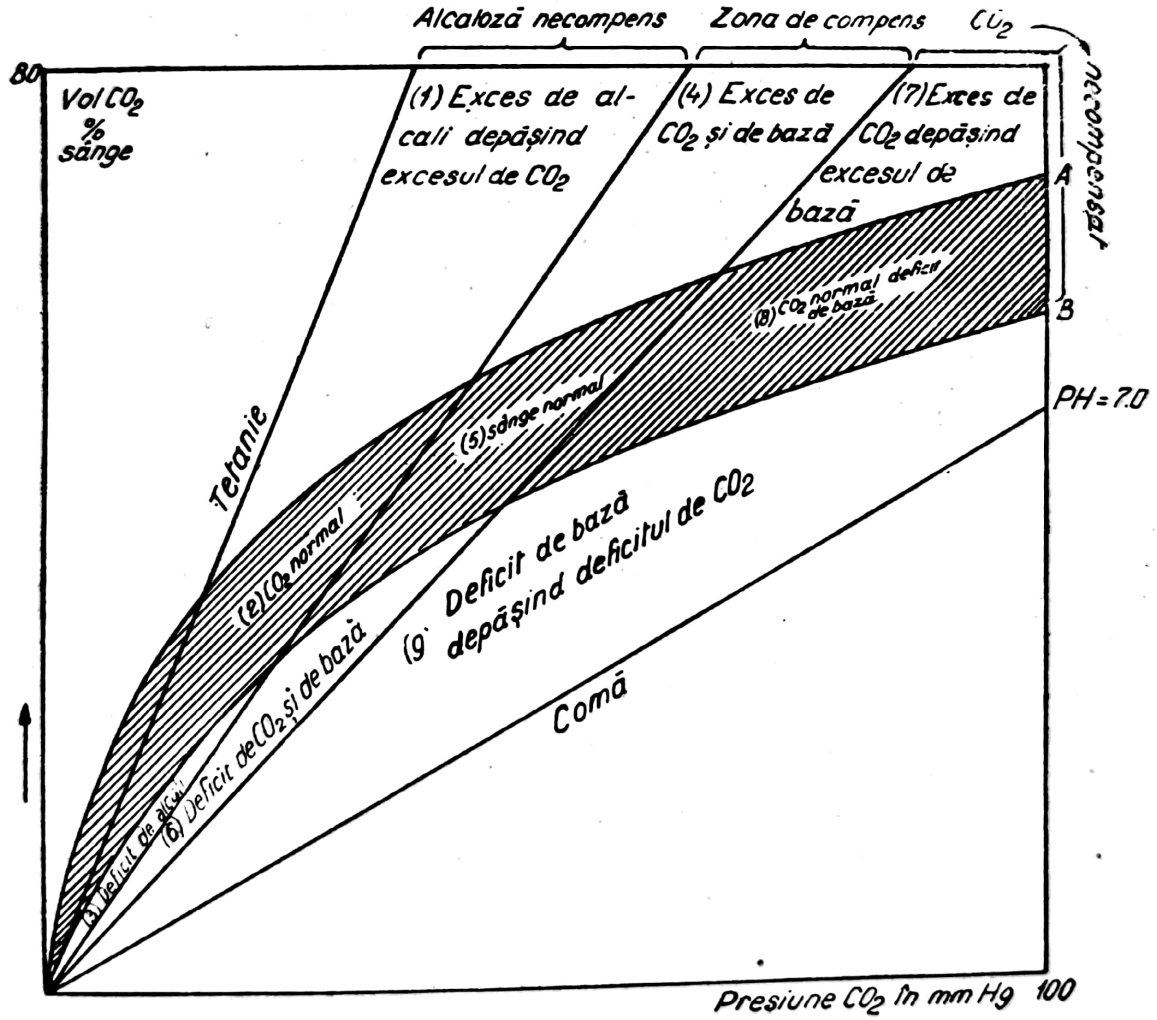


Fig. 127. Schema lui Van Slyke

O altă clasificare a tipurilor de desechilibru acido-bazic, din sânge, atât în stările fiziologice, cât şi în cele patologice, utilizând o reprezentare grafică, a fost făcută de Van Slyke, Peters şi Bars (fig. 127).

După acești autori, valoarea CO_2 total din sângele normal la 38°, sub o presiune de 40 mm Hg, este cuprinsă între 43—55 volume CO_2%.

Variațiile CO_2 total în funcție de presiunea CO_2 sunt reprezentate grafic prin curbele *A* și *B*, *A* fiind limita superioară, iar *B* limita inferioară. Dacă pe aceste curbe se duc dreptele corespunzătoare pH-urilor limită fiziologice 7,30—7,45 și cele corespunzătoare pH-urilor limită patologice 7,0—6,8 calculate cu ajutorul formulei Henderson — Hasselbach (o asemenea formulă fiind expresia matematică a unei drepte), se obțin 9 zone, care se pot nota dela 1 la 9 și care corespund tuturor tipurilor de acidoză și alcaloză deduse după clasificarea lui Haldane, și anume:

1, 2 și 3 corespund unui pH alcalin, unei alcaloze necompensate în (1) prin exces de bicarbonat (alcaloză fixă), *alcaloză negazoasă necompensată* în (3) prin deficit de acid, *alcaloză gazoasă necompensată* în (2) alcaloză prin variația ambilor termeni, dar în proporții inegale, ceeace duce la un conținut normal în CO_2 față de un conținut crescut în CO_3HB, *alcaloză mixtă*.

Zonele 4, 5 și 6 corespund valorilor de pH în limite normale: zona (4) corespunde *alcalozei negazoase compensate*, (5) este zona normală în care bicarbonații, acidul carbonic și pH-ul sunt normali, iar (6) dă valorile *acidozei negazoase compensate* sau acidoza fixă compensată.

Zonele 7, 8 și 9 corespund unei scăderi a pH-ului, deci unei zone decompensate, în (7) și (8) prin exces de acid, *acidoză gazoasă necompensată*.

In (9) o *acidoză negazoasă necompensată*, cauzată de un deficit de alcali.

Să analizăm acum toate tipurile de acidoză și alcaloză.

1. **Acidoza negazoasă** (bicarbonații scad).

a) *Experimental* se obține acidoză de acest tip injectând în vena unui animal, de exemplu la câine, un acid tare (cum este acidul clorhidric); acesta descompune bicarbonații cu formare de săruri ale acidului tare și acid carbonic:

$$CO_3HNa + HCl = NaCl + CO_3H_2.$$

Cu cât adăugăm mai mult acid, cu atât e descompusă o cantitate mai mare de bicarbonat, ducând la un exces de acid carbonic prin deficit de baze. Este ceeace se numește *acidoza fixă*. Organismul luptă ca să echilibreze această scădere a bicarbonaților, printr'o scădere a acidului carbonic, pentru ca raportul $\frac{(CO_3HB)}{(CO_3H_2)}$ să nu se modifice. Crește eliminarea CO_2 printr'o ventilație pulmonară exagerată. Centrul respirator bulbar este foarte sensibil, atât la variațiile de pH, cât și la variațiile de CO_2. Când are loc o acidificare prin deficit de baze, centrul respirator bulbar comandă o hiperventilație. Se elimină o cantitate de CO_2 până ce raportul bicarbonat/acid carbonic se restabilește. In acest caz, organismul a reușit să readucă raportul $\frac{(CO_3HB)}{(CO_3H_2)}$ la valoarea normală (scade de exemplu dela 60/3 la 40/2, dar raportul e același în jurul lui $\frac{20}{1}$), pH-ul nu se modifică, acidoza inițială provocată printr'o deficiență de baze alcaline este *compensată*, organismul a învins această acidoză. Când cantitatea de acid injectată este prea mare, ventilația pulmonară nu reușește să elimine CO_2 în aceeași măsură în care scad bicarbonații, raportul $\frac{(CO_3HB)}{(CO_3H_2)}$ scade,

pH-ul scade. Şi, dacă rinichiul nu reuşeşte să elimine acizii, fie ca atare, fie sub formă de săruri de amoniu, organismul nu-şi restabileşte pH-ul, se produce o *acidoză necompensată* care poate duce la o scădere a pH-ului până la 7,10—7, când survine moartea prin comă.

b) *Fiziologic*, acidoza negazoasă compensată sau necompensată se întâlneşte după eforturi musculare intense. Această acidoză e provocată de *acidul lactic* care apare în urma eforturilor musculare şi care difuzează din muşchi în sânge.

Dispneea alergătorului la sfârşitul efortului este datorită tocmai hiperventilaţiei necesare pentru a compensa scăderea CO_3HB printr'o scădere a CO_3H_2. Din punct de vedere clinic, aceste acidoze sunt foarte interesante.

c) *Patologic*, acidoza negazoasă se întâlneşte la două mari clase de intoxicaţii acide, şi anume aceea datorită apariţiei în organism de *acizi cetonici* (acidul diacetic, β-oxibutiric şi acetona) şi aceea datorită apariţiei în organism de *fosfaţi acizi* sau *acid sulfuric*, proveniţi din degradarea proteinelor.

In clasa *acidozelor* provocate de *acizi cetonici* intră :

α) acidoza diabeticilor,
β) acidoza după vărsături incoercibile la gravide şi copii şi
γ) acidoza după dietă hidrică.

In a doua clasă intră *acidoza nefreticilor*, unde se produce retenţie de fosfaţi, acizi sau acid sulfuric datorită incapacităţii rinichiului de a elimina suficient de bine acizii fosforici sau sulfurici rezultaţi din metabolismul fosfoproteinelor şi sulfoproteinelor. După Ambard, acidoza nefreticilor ar fi datorită unei retenţii de clor. In nefritele cu edem, rinichiul nu poate elimina Cl din NaCl în aceeaşi măsură cu Na ; clorul e reţinut sub formă de HCl, ceeace produce acidoză. După acest autor, şi acidoza diabeticilor ar fi datorită unei supraîncărcări cu acid a proteinelor din centrii nervoşi, ceeace duce la hiperventilaţie pulmonară, scădere a CO_2 din sânge şi, ca o consecinţă, scăderea bicarbonaţilor, deoarece aceştia se echilibrează cu CO_2 din sânge. Oricare ar fi acidul care apare în exces în organism, el descompune bicarbonaţii. Acidul carbonic ajunge în exces faţă de bicarbonaţi, ceeace duce la o scădere a raportului $\frac{(CO_3HB)}{(CO_3H_2)}$. Pentru a restabili acest raport, organismul reacţionează printr'o hiperventilaţie pulmonară şi în acelaş timp printr'o eliminare prin urină a acestor acizi, fie ca atare, fie în special sub formă de săruri de amoniu. Dacă acest efect de compensare este eficace, acidoza este compensată ; nu se produce modificarea pH-ului. Singurul lucru care s'a modificat este rezerva alcalină. In cazul unei deficienţe renale, formarea renală de amoniac este oprită, acizii nu se elimină şi poate avea loc o scădere a rezervei alcaline la 12 ; 15 ; 20 volume CO_2%. In acest moment, pH-ul scade la 7,10 şi chiar 7 şi se instalează o *acidoză necompensată* cu toate simptomele ei, care duc la aşa zisa *comă acidozică*, stadiul clinic terminal al acidozei necompensate.

2. **Acidoza gazoasă** (acidul carbonic liber creşte).

a) *Experimental* se poate provoca o acidoză gazoasă făcând animalul să respire un aer mai bogat în CO_2 decât aerul alveolar (să conţină în loc de 5—6% CO_2, 6—7% CO_2) sau scăzând excitabilitatea centrului respirator, de exemplu, prin anestezie cu morfină sau eter.

Scanned with OKEN Scanner

b) *Patologic*, acidoza gazoasă se întâlneşte în toate bolile în care ventilaţia pulmonară este scăzută sau încetinită (de exemplu, în afecţiunile pulmonare, în tuberculoza pulmonară cu leziuni întinse). Mult timp este compensată şi pH-ul rămâne în limite normale. Compensarea se face printr'o creştere în acelaş sens a bicarbonaţilor care sunt furnizaţi de sistemul Hb/HbO_2 prin marea capacitate a acestuia de a fixa CO_2, îmbogăţind ulterior, prin schimbul de ioni Cl^- şi CO_3H^-, conţinutul plasmei în bicarbonaţi. Această creştere a bicarbonaţilor compensează creşterea CO_2, astfel că raportul $\frac{(CO_3HB)}{(CO_3H)}$ rămâne constant; mult timp pH-ul nu se modifică. In această acidoză intervine însă şi o compensare datorită rinichiului care nu mai elimină alcalii din sânge, ci elimină acizii sub formă de săruri de amoniu. In cazul nefritelor, formarea amoniacului fiind oprită, eliminarea acidă nu se face sub formă de săruri de amoniu, ci sub forma de bicarbonaţi. In aceste condiţii se produce decompensarea, deci *acidoza gazoasă necompensată*. Se întâlneşte în asfixia produsă de un spasm al glotei, în obstrucţia acută a laringelui, în astmul bronşic, în bronhopneumonie.

Alcalozele prezintă din punct de vedere clinic o importanţă mai mică. Alcaloza, spre deosebire de acidoză, este compatibilă cu o stare fiziologică normală. Chiar la variaţii ale pH-ului cu 0,3—0,4 unităţi nu produce turburări prea serioase. In genere, alcalozele sunt compensate. Să le analizăm pe rând.

3. **Alcaloza negazoasă** (bicarbonaţii cresc). Se mai numeşte alcaloză fixă.

a) *Experimental* se realizează făcând să se ingereze cantităţi mari de *bicarbonaţi alcalini*. Organismul se apără împotriva acestei intoxicaţii printr'o eliminare mai mare de alcali prin urină, printr'o scădere a secreţiei urinare de amoniac, prin creşterea acidului carbonic în sânge, centrul respirator reţinând cât mai mult CO_2 prin micşorarea volumului de aer inspirat. In cursul digestiei apare o alcaloză negazoasă, natural compensată.

b) *Patologic* se produce *alcaloză negazoasă* în obstrucţia pilorului (deficienţă în acid clorhidric), în epilepsie, în vărsăturile incoercibile ale sarcinii, în tetanie.

4. **Alcaloza gazoasă** (acidul carbonic scade).

Corespunde unei eliminări exagerate de CO_2.

a) *Fiziologic* corespunde unei *ventilaţii pulmonare exagerate*, de exemplu la altitudini mari, şi e datorită unei hiperventilaţii produse de o lipsă de oxigen.

b) *Experimental* se poate provoca printr'o *hiperventilaţie* prelungită, realizându-se un pH = 7,8, cu producere de fenomene tetanice.

c) *Fiziopatologic*, această alcaloză este de mare importanţă şi are o cauză unică: scăderea acidului carbonic; se numeşte *hipocapnie* prin hiperventilaţie datorită unei lipse de oxigen la nivelul celulelor. Centrul respirator bulbar este extrem de sensibil, atât la variaţii de oxigen, cât şi la variaţii de pH. Ori de câte ori oxigenul este în deficit, centrul respirator bulbar comandă o hiperventilaţie, care produce o eliminare excesivă de CO_2, o hipocapnie ce duce la rândul ei la o *alcaloză gazoasă*. Această lipsă de oxigen poate fi cauzată de:

α) Leziuni pulmonare întinse care împiedică oxigenarea normală a sângelui. Oxigenarea am văzut că e strâns legată de CO_2 din sânge. Redu-

cerea e întovărășită de o fixare de CO_2, oxigenarea, la nivelul alveolelor pulmonare, fiind întovărășită de o pierdere de CO_2.

β) Insuficiența cantității de hemoglobină:

— în anemiile primitive sau secundare (hemoragice);

— în intoxicația cu CO, unde o mare cantitate de hemoglobină e blocată sub formă de carboxihemoglobină și nu mai poate juca rol de vector de oxigen. Necesitatea de oxigen produce o hiperventilație care duce la o scădere a CO_2, deci la o alcaloză gazoasă. Când nu e compensată, aceasta duce la apnee.

Noțiunile de hiper- și hipocapnie se referă la starea de excitabilitate a centrului respirator. După Hasselbach, hipocapnia corespunde scăderii rezervei alcaline (excitabilitatea centrului respirator crescută, scade CO_2 alveolar), hipercapnia corespunde creșterii rezervei alcaline (excitabilitatea centrului scăzută, crește CO_2 alveolar).

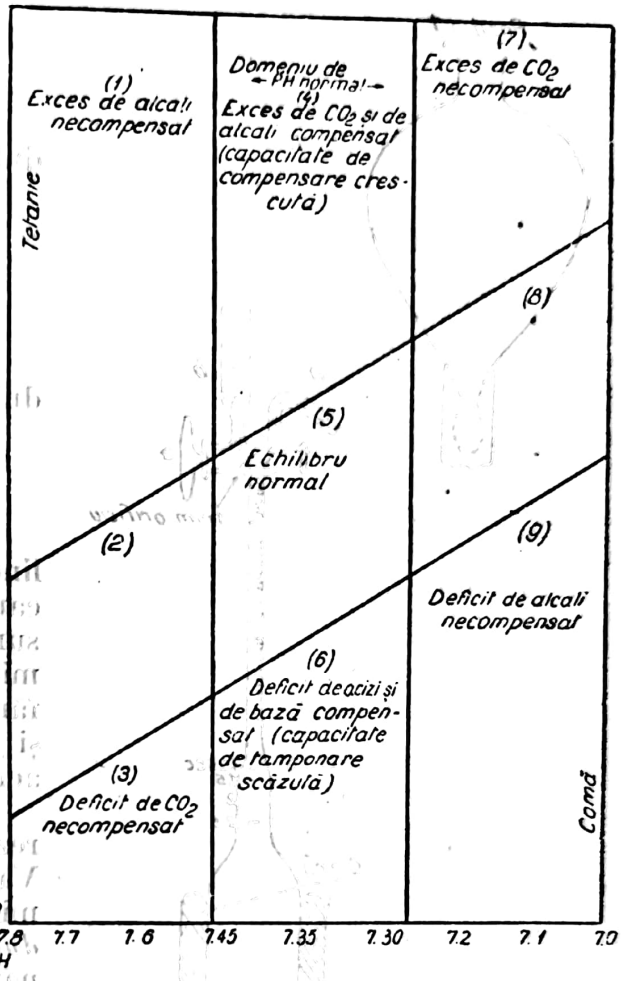


Fig. 128. Domeniul de pH compatibil cu viața.

Toate acidozele, oricare ar fi cauza sau origina lor, au un simptom caracteristic: dispneea de tip Kussmaul („respirație profundă de tip Kussmaul"), compusă din inspirații adânci, urmate de expirații forțate, adesea zgomotoase. Uneori o pauză separă cei doi timpi ai respirației.

Toate acidozele se traduc prin emisiunea unei urini mai acide și printr'o eliminare crescută de amoniac; alcalozele, prin emisiunea unei urini alcaline, cu scăderea sau lipsa totală a amoniacului.

Acidozele circulatorii. Dautrebande admite că în afară de stările de acidoză existente în organismul ca un tot (acidoză diabetică, nefritică, etc.), comune tuturor țesuturilor, există turburări localizate ale echilibrului acido-bazic; ar putea să existe o acidoză într'o anumită regiune și simultan o alcaloză în altă regiune. In special în bolile de inimă se poate observa acest lucru, datorită unei încetiniri a circulației. Există o acidoză trecătoare în sângele venos, alcaloză în sângele arterial (trecătoare). Dautrebande explică acidozele circulatorii astfel: staza venoasă antrenează o retenție de CO_2 în sânge, ionii clor trec din plasmă în globule, bicarbonații din plasmă cresc, conținutul în hemoglobină al sângelui crește. Trecerea apei din plasmă în țesuturi antrenează și bicarbonații și clorul, de unde o descreștere a rezervei alcaline.

Metodele de cercetare a echilibrului acido-bazic

Simptomele desechilibrului acido-bazic se caută în *sânge*, în *urină*, în *aerul alveolar*.

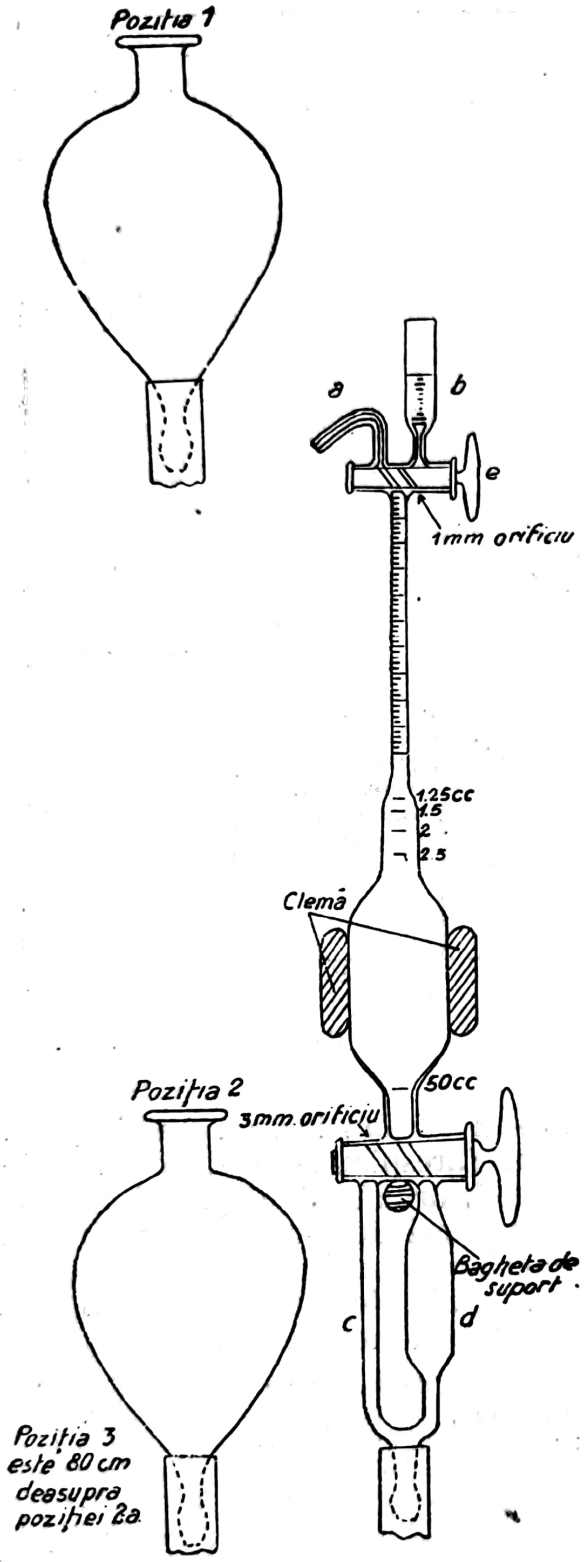


Fig. 129. Aparat Van Slyke pentru determinarea rezervei alcaline.

In sânge se determină:
1. rezerva alcalină,
2. pH-ul,
3. corpii cetonici (acetona, acidul acetilacetic, acidul β-oxibutiric).

In urină se determină:
1. pH-ul,
2. aciditatea totală,
3. amoniacul,
4. toleranța la alcali,
5. corpii cetonici (acetona, acidul acetilacetic, acidul β-oxibutiric)

In aerul alveolar:
Determinarea CO_2 alveolar.

In sânge

1. **Determinarea rezervei alcaline.** Pentru rezerva alcalină, precauțiile pentru recoltarea sângelui sunt acelea indicate pentru determinarea pH-ului sanguin (recoltare fără stază, pe un anticoagulant și antiglicolitic, ferit de contact cu aerul — sub pătura de parafină).

Aparatul pentru determinarea rezervei alcaline e aparatul lui Van Sliyke (fig. 129). Nu se determină bazele din bicarbonați, ci *acidul carbonic total* (liber și combinat) fixat de bazele alcaline, *eliberat în vid cu ajutorul unui acid puternic* (SO_4H_2 în general). Această metodă cuprinde o anumită eroare, deoarece există CO_3H_2 combinat și cu proteine, dar acest lucru nu se poate evita și pentru a reduce această eroare la minimum nu se lucrează pe sânge total, ci pe *plasmă* care conține mai puține proteine. Se lucrează pe 1 cc plasmă după ce a fost supus unei presiuni de CO_2 egală cu a aerului alveolar; se introduce în aparatul special al lui Van Slyke, umplut cu mercur, deci în care există vid complect, și se adaugă acid sulfuric diluat (1/20); acesta va descompune bicarbonații, liberând CO_2 din toate combinațiile sale. Se determină CO_2 degajat în vid și se face corecția de presiune și de temperatură (0°, 760 mm Hg). Cu ajutorul unor tabele se calculează, din cantitatea de CO_2 degajată, cantitatea de CO_2 corespunzătoare bicarbonaților.

Rezerva alcalină normală este de 53—75 vol. CO_2 la 100 cc plasmă. CO_2 liber este 2,5—3,5 vol. %.

Patologic se pot observa scăderi până la *15 volume* %. In acidoze negazoase (diabet, nefrite) poate scădea la 40; 30; 20 şi chiar 15%, ultimele cifre fiind în *acidozele necompensate.*

2. **Determinarea pH-ului.**

Se face după tehnica electrometrică, de preferinţă cu electrod de sticlă sau chiar în sângele circulant. Valorile normale: 7,30—7,45. Variaţii patologice către 7,8 şi 6,8.

3. **Corpii cetonici.** Se dozează corpii cetonici totali (acetona, acidul diacetic, acidul β-oxibutiric).

Determinările se fac pe sângele total, plasmă sau ser.

Normal: 1—2 mg ‰.

In urină.

1. **pH-ul** se determină numai pe urina proaspătă, imediat după emisiune, cu metoda colorimetrică.

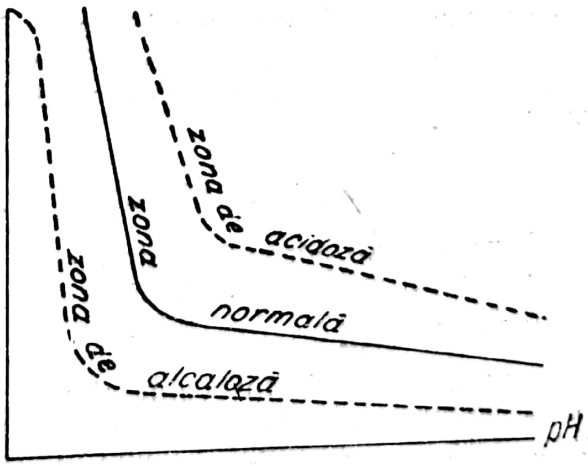
2. **Aciditatea totală,** deasemenea pe urina proaspătă imediat după recoltare, prin titrare cu alcali.

3. **Amoniacul** se determină cu formol şi titrarea cu NaOH. Se exprimă în cc $\frac{N}{10}$ NaOH. Normal variază între 300—500 cc amoniac n/10 în 24 de ore. In acidoză poate atinge valori de 10 ori mai mari, până la 5 000 cc.

Invers, în alcaloze, amoniacul poate să scadă la zero. Amoniacul urinar e astfel un indice al reacţiei sângelui. Amoniacul urinar există în cantităţi cu atât mai mari, cu cât acidoza din sânge e mai mare, deci cu cât trebue eliminaţi mai mulţi acizi.

Hiperamoniuria întovărăşeşte stările de acidoză, afară de cazul când există o leziune a parenchimului renal. *Hipoamoniuria* indică alcaloză (după ingestie de bicarbonaţi, amoniacul dispare din urină, deasemenea după o hiperventilaţie pulmonară prelungită). După Hasselbach, raportul $\frac{N \text{ amoniacal}}{N \text{ total}} \times pH =$ constant pentru un individ dat. Este coeficientul amoniacal redus. Dacă se face o curbă a variaţiei raportului $\frac{N \text{ amoniacal}}{N \text{ total}}$ numit şi *coeficient amoniacal,* în funcţie de pH-ul urinii (punând valoarea acestui raport în ordonată şi valoarea pH-ului în abscisă), se obţine o curbă în formă de hiperbolă echilaterală (fig. 130).

S'a încercat să se înlocuiască acest coeficient de acidoză al lui Hasselbach cu alţi coeficienţi $\left(\text{de exemplu, } \frac{N \text{ amoniacal}}{N \text{ uric}}\right)$, ticiunul nu e însă pe deplin sanisfăcător.



Acidoza deplasează curba în sus (mai mult amoniac pentru acelaş pH), alcaloza o deplasează în jos (un acelaş pH va furniza cantităţi mai mici de amoniac).

Fig. 130. Variaţiile coeficientului amoniacal în acidoză şi alcaloză

Determinarea *pH-ului* urinar, a *aciditățiI totale* de titrare și a *amoniacului* ne dă o primă indicație de *acidoză* sau *alcaloză*.

4. **Toleranța la alcali.** Se administrează bicarbonat de sodiu per os sau intravenos în cantități mici, până ce reacția urinii devine alcalină. Se notează cantitatea de bicarbonat care a realizat această modificare. Normal, 0,5 g bicarbonat pe kilocorp (per os) sunt suficiente pentru a produce o reacție alcalină în urină. In acidoză, cantitatea necesară e crescută. In acidoză severă, această cantitate poate fi de 1,1 g bicarbonat pe kilocorp.

5. **Acetonuria** se determină calitativ cu metoda Legall modificată de Imbert (nitroprusiat de sodiu în soluție de acid acetic), iar *diacetonuria*, cu reacția Gerhart (perclorură de fier).

Se face și dozajul cantitativ cu tehnica Van Slyke.

In aerul alveolar se determină CO_2.

La indivizii normali, conținutul în CO_2 al aerului alveolar este o constantă, 5,6%, corespunzător la 40 mm Hg presiune, aceasta fiind egală cu presiunea la care se găsește CO_2 disolvat în sângele arterial; când acidul carbonic liber din sânge scade, scade și CO_2 din aerul alveolar

Tabelul 36

Forma de desechilibru (denumirea și modificarea primară)	Rezerva alcalină	Aciditatea urinară	Amoniacul urinar	CO_2 alveolar	Ventilația pulmonară
Acidoză gazoasă (CO_3H_2 *crescut*) . . .	crescută	crescută	crescut	crescut	încetinită
Acidoză negazoasă (CO_3HB *scăzut*) . .	scăzută	crescută	crescut	scăzut	accelerată
Alcaloză gazoasă (CO_3H_2 *scăzut*) . . .	scăzută	scăzută	scăzut	scăzut	accelerată
Alcaloză negazoasă (CO_3HB *crescut*) .	crescută	scăzută	scăzut	crescut	încetinită

la 30; 20; 10 mm. Primele cifre corespund unei acidoze negazoase compensate, ultimele unei acidoze negazoase necompensate.

Normal 5,3—6,3 vol. CO_2 corespunzător unei presiuni de 38—45 mm Hg.

In acidozele diabetice moderate, tensiunea CO_2 alveolar scade la 34—32 mm Hg, în acidozele grave atinge 28—25 și chiar 15 mm Hg.

CO_2 alveolar se determină cu aparatul Fredericia sau Haldane.

In raport cu stigmatele acidozelor și alcalozelor se poate face o clasificare a acidozelor și alcalozelor într'un tabel (tabelul 36) care rezumă în acelaș timp repercusiunile desechilibrului acido-bazic în *sânge*, *urină* *aer alveolar*.

ELEMENTELE FIGURATE ALE SÂNGELUI

Sângele uman normal conține următoarele elemente figurate: globule roșii (hematii, eritrocite), plachete (trombocite) și globule albe (leucocite).

Globulele roșii

Reprezintă 45% din volumul sanguin. Numărul lor e în medie de 5 000 000 pe mm^3 sânge la bărbat și 4 500 000 la femeie. Suprafața lor totală este de aproximativ 2 000 metri pătrați. La majoritatea mamiferelor au forma de discuri circulare, subțiate în centru, uneori strânse în fișic ca monetele. Dimensiunea globulului roșu variază dela specie la specie, între 2 și 9μ în diametru, la om în medie 7μ. Globulele roșii adulte, la mamifere, sunt anucleate (numai după hemoragii, când activitatea organelor

hematopoetice este stimulată, pot apărea eritrocite nucleate). La păsări, reptile, pești, amfibii globulele sunt ovoide și nucleate. 80% din massa eritrocitului este constituită din hemoglobină, iar restul constitue stroma globulară. Când presiunea osmotică a mediului care înconjoară globulul roșu este mai mică decât presiunea osmotică din interiorul lui, în condiții de *hipotonie*, globulul roșu absoarbe apa, eliberează hemoglobina, hemolizează. Dacă se centrifughează sânge „lacat", adică sânge ale cărui globule roșii nu mai conțin hemoglobină, se depune stroma globulară, care este constituită dintr'o proteină de tipul globulinelor și din nucleoproteine, lipide, glucoză, cloruri, fosfați de sodiu și potasiu, din o serie de compuși fosforați ca esterul monofosforic și difosforic al acidului gliceric, un ester fosforic al acidului piruvic:

$CH_2-O-PO_3H_2$	$CH_2O-PO_3H_2$	$CH_2O-PO_3H_2$
|	|	|
CHOH	$CHO-PO_3H_2$	CO
|	|	|
COOH	COOH	COOH
ester monofosforic al acidului gliceric	ester difosforic al acidului gliceric	ester fosforic al acidului piruvic.

Când mediul extern care scaldă globulul are o presiune mai mare decât a acestuia — soluții hipertonice —, apa părăsește globulul, care devine mic și chircit. In condiții de hipertonie puternică (soluții NaCl 10%), membrana globulului este deteriorată progresiv și se produce hemoliza.

Tabelul 37

Compoziția globulelor roșii la om, oaie și câine

	Om ‰	Oaie ‰	Câine ‰	In procente, compoziția în stare uscată este următoarea:	
Apă	600	590	630	Hemoglobină	86,79%
Reziduu sec	400	410	370	Albumină	10%
Hemoglobină	310	316	327	Lecitină	0,72%
Albumină	—	64	10	Colesterol	0,16%
Zahăr	0,6	—	—	Săruri minerale	2,37%
Colesterol	—	3,4	2,2	iar substanțele azotate:	
Lecitină	—	3,7	2,6	Uree	0,25‰
Sodiu	0,75	2,2	2,8	Acid uric	0,020—0,045‰
Potasiu	4,3	0,7	0,3	Aminoacizi	0,080‰
Calciu	0,02	—	—	Glutation	0,75—1,25‰
Magneziu	0,01	0,1	0,1		
Clor	1,9	1,8	1,4		
Bicarbonat	2,1	0,7	1,6		
Fosfați	—	0,4	0,2		

Pentru studiul circulației globulelor roșii în organism s'a folosit fier radioactiv (^{55}Fe sau ^{59}Fe). S'a constatat că globulele roșii conținând fier radioactiv apar în circulație în 24 de ore și numărul lor atinge un maximum în 21 de zile.

Viața unui globul este în medie de șase săptămâni. Pentru a menține constant echilibrul hematic al organismului intervin organele hematopoetice (măduva oaselor, splina, ficatul).

Variații fiziologice ale numărului globulelor roșii. Numărul globulelor roșii crește după transfuzie, prin ședere la altitudini mari (peste 7 000 000 pe mm^3), după efort muscular, în stări emotive, după băi calde sau reci (aceasta ar fi datorită unui aport de sânge concentrat din splină și unei stimulări a hematopoezei în măduva oaselor).

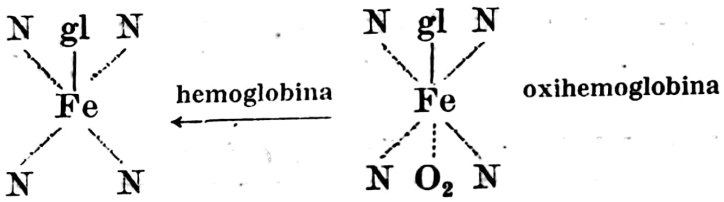
In cazuri patologice, numărul globulelor roșii crește, ca un efect compensator al unei slabe tensiuni a oxigenului în sânge, de exemplu, în emfizem, intoxicație cronică cu CO_2, intoxicații cu arsenic, fosfor, mangan.

In policitemie se pot atinge valori de 11 000 000 globule roșii pe mm^3 sânge. Se pot provoca experimental policitemii cu săruri de cobalt. Numărul globulelor roșii scade în diversele forme de anemii.

Rolul principal al globulului roșu este acela de vector de oxigen, grație conținutului lui mare în hemoglobină.

Hemoglobina

Hemoglobina este pigmentul colorat al sângelui și cantitativ cea mai importantă componentă proteică din sânge (14—16 g%). Este o heteroproteină, componenta prostetică fiind hemul, iar cea proteică globina, în raport stoichiometric una față de cealaltă, legătura făcându-se prin atomul de Fe



Sinteza hemoglobinei se crede că are loc în nucleii celulari ai măduvei oaselor. Poate fi sintetizată în organism din componente simple, acid acetic, glicocol, prolină, oxihemoglobină, triptofan.

Fig. 131. Oxihemoglobina cristalizată din sângele de cobai.

Pentru sinteza hemoglobinei, sinteza globinei este un factor de primă importanță. Deasemenea, fierul este indispensabil sintezei hemoglobinei. Hemoglobinele diverselor specii sunt imunologic diferite. Componenta proteică este diferită. Hemoglobina fetală și aceea a adultului diferă între ele prin aviditate pentru oxigen, imobilitate electroforetică, solubilitate, rezistență la alcali.

Combinația hemoglobinei cu oxigenul. Hemoglobina are capacitatea de a se uni reversibil cu oxigenul conform reacției :

$$\underset{\text{hemoglobină}}{Hb} + O_2 \rightarrow \underset{\text{oxihemoglobină}}{HbO_2}$$

datorită căreia îi revine rolul fundamental de rezervor şi transportor de oxigen în organism.

Oxihemoglobinele diverselor animale au forme cristaline (fig. 131, 132, 133, 134) şi spectre de absorbţie diferite, deasemenea carboxihemoglobinele (fig. 135, 136). Componenta globinei determină caracterele de diferenţiere. Oxigenul se combină probabil cu fierul din moleculă. Intre presiunea parţială a oxigenului şi gradul de saturare a hemoglobinei cu oxigen există proporţionalitate. Se poate exprima grafic cu ajutorul unei curbe, aşa numita *curbă de disociere a oxihemoglobinei*; curba este o hiperbolă rectangulară şi este în funcţie de pH şi temperatură (fig. 137).

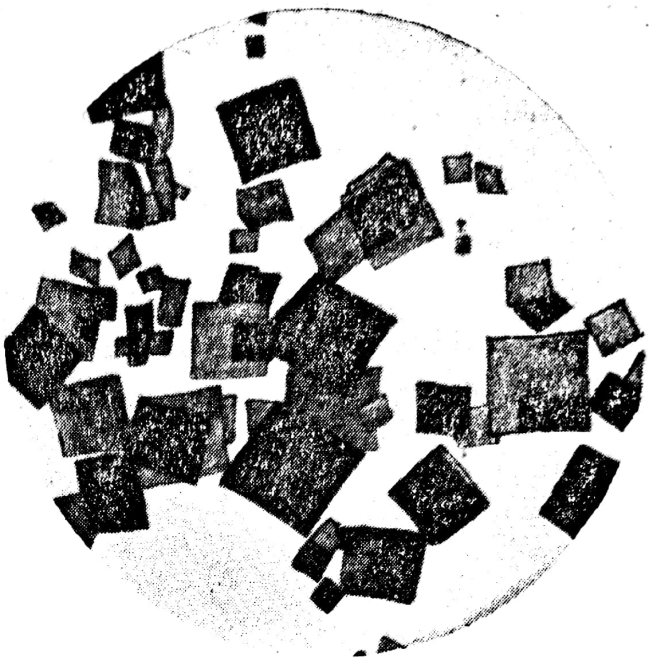


Fig. 132. Oxihemoglobina cristalizată din sângele de şobolan.

Se supune o soluţie de hemoglobină sau sânge total în anumite condiţii unor tensiuni variabile de oxigen (0, 10, 20, 40 . . .100 mm Hg); se determină în soluţie cantitatea de oxihemoglobină — respectiv proporţia dintre oxihemoglobină şi hemoglobină. Se constată următoarele (vezi curba): când se atinge echilibrul cu aerul alveolar (tensiunea oxigenului aproximativ 90—100 mm Hg), practic toată hemoglobina este sub formă de oxihemoglobină, deci saturarea 100%. Când sângele trece prin capilarele tisulare, oxigenul difuzează din plasmă în lichidele tisulare, tensiunea oxigenului scade la aproximativ 40 mm Hg. In aceste condiţii, oxihemo-

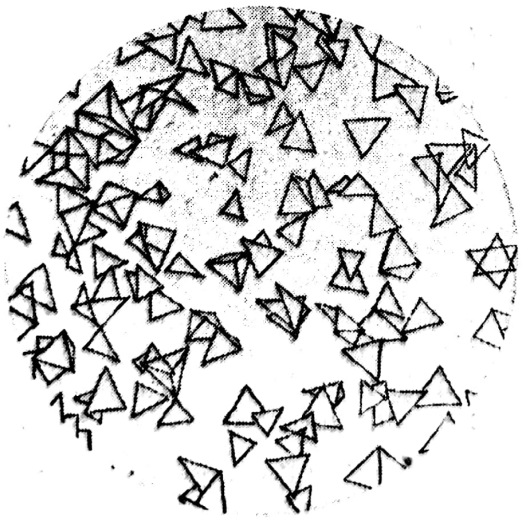


Fig. 133. Oxihemoglobina cristalizată din sângele de cal.

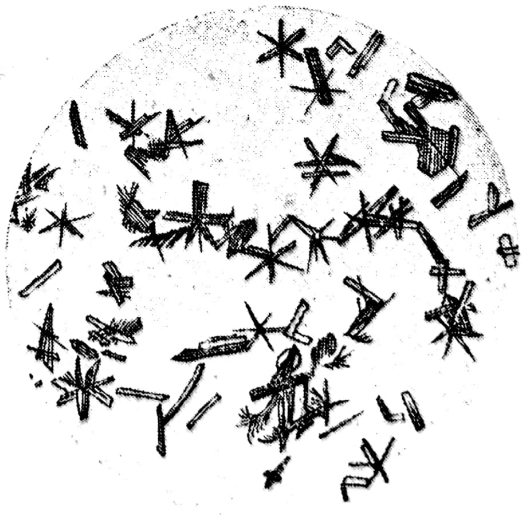


Fig. 134. Oxihemoglobina cristalizată din sângele de câine.

Scanned with OKEN Scanner

globina cedează aproximativ 75% din oxigen. Cu cât tensiunea de oxigen scade, cu atât disociația hemoglobinei crește.

Saturarea în oxigen a unei soluții apoase de hemoglobină urmează legea acțiunii masselor. Curba de disociere calculată pe baza legii acțiunii

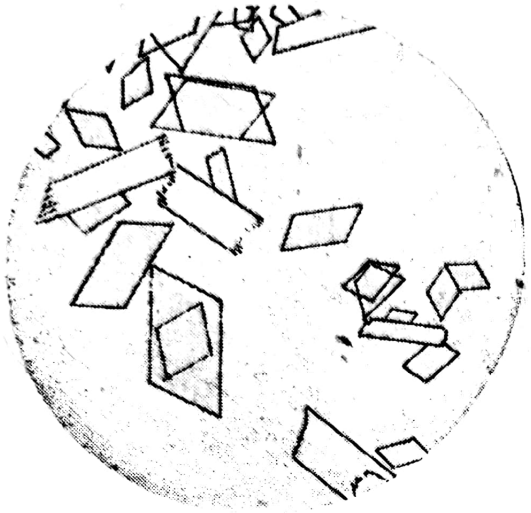


Fig. 135. Cristale de carboxihemoglobină din sânge de bou

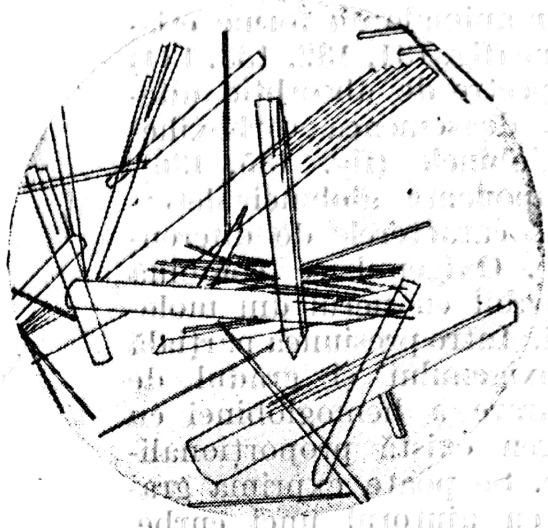


Fig. 136. Cristale de carboxihemoglobină din sânge de porc

masselor ar indica faptul, că în condiții fiziologice, combinarea oxigenului cu hemoglobina ar avea loc prin patru reacții simultane, și anume:

$Hb_4 - O_2 = Hb_4O_2$
$Hb_4 - 2O_2 = Hb_4O_4$
$Hb_4 - 3O_2 = Hb_4O_6$
$Hb_4 - 4O_2 = Hb_4O_8$

Rezultanta acestor reacții dă curba caracteristică de disociere a oxigenului hemoglobinei. O modificare a pH-ului duce la o modificare a afinității Hb pentru oxigen: acidificarea aduce o reducere a acestei capacități (de exemplu, în cazul liberării de CO_2 și acid lactic în timpul activității celulare).

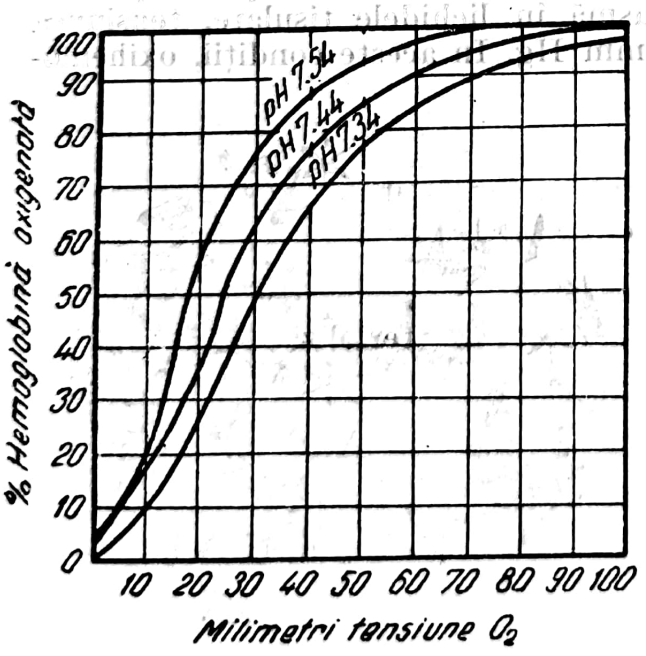


Fig. 137. Curba de disociație a oxihemoglobinei în funcție de tensiunea oxigenului pentru diverse valori de pH.

Am văzut la capitolul asupra hemoglobinei că aceasta are capacitatea de a se combina și cu CO și că afinitatea pentru CO este de 200 de ori mai mare decât pentru oxigen.

Testele pentru hemoglobină sunt bazate pe proprietatea peroxidazică a hemoglobinei (reacția cu benzidină, reacția de recolorare a fenolftaleinei și testul de hemină — cristalele lui Teichmann). Cristalele de hemină rezultă din descompunerea hemoglobinei (fig. 138).

Plachetele sanguine sau trombocitele

Sunt mici elemente discoide sau fuziforme care se găsesc în

număr de 200 000 — 300 000 pe mm³ sânge, având un diametru de 2,5 μ. Sunt compuse din albumină și nucleină și conțin granulații azurofile. Conțin o cantitate mare de histamină. Se crede că-și au origina în celulele figurate ale măduvei. Intervin în procesul de coagulare, producând trombokinaza. Prezența lor este necesară pentru retracția chiagului (limfa, care nu conține placheta, dă un chiag care nu se retractă). Contribue la oprirea hemoragiilor, și probabil au rol hipotensiv (injectate intravenos). Au deasemenea o așa numită funcție antixenică, având capacitatea de a fixa corpii microbieni morți și particulele de cerneală de China în suspensie în sânge. După unii cercetători ar conține enzime proteolitice.

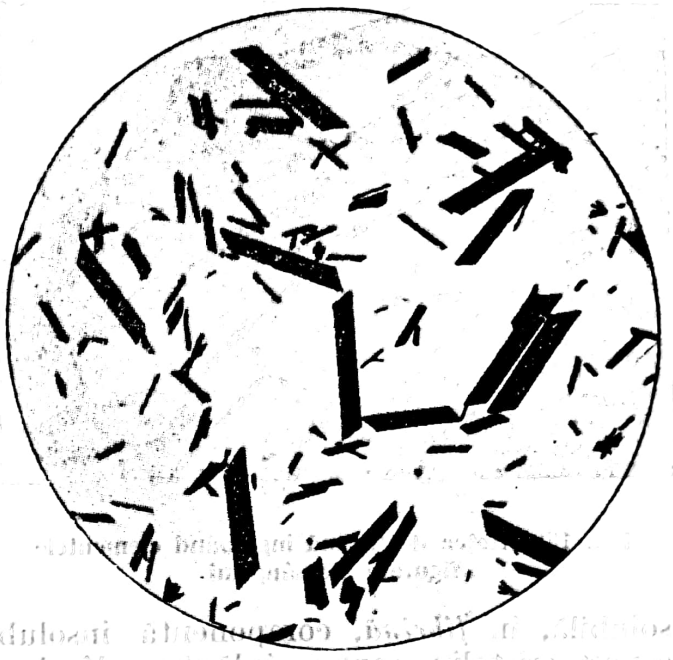


Fig. 138. Cristale de hemină

GLOBULELE ALBE SAU LEUCOCITELE

Leucocitele (neutrofile, eozinofile, bazofile, limfocite, monocite) conțin substanțe organice și minerale. Printre substanțele organice predomină nucleoproteinele; mai conțin și lipoizi, granulații de glicogen, acid ascorbic; sunt bogate în Ca, Fe. Sunt sediul unui complex enzimatic foarte activ, în special conțin enzime proteolitice și glicolitice și oxidaze, peroxidaze, lipaze, catalaze, amilaze.

Numărul total de leucocite variază între 5 000 — 10 000 pe mm³ (în medie 7 000 mm³). Au o viață scurtă de 3 — 4 zile, dar produsele lor de desintegrare pot servi la reedificarea unor noi globule albe.

Rolul leucocitelor este complex. Grație mobilității lor se strecoară printre celulele endoteliilor vasculare (diapedeză). In condiții fiziologice, leucocitele migrează, ajungând în lumenul tubului digestiv, luând parte la procesul de absorbție a alimentelor. In condiții patologice, leucocitele îndeplinesc funcția de fagocitoză, de bacterioliză, de hidroliză.

Se întâlnesc *leucocitoze* fiziologice: după digestie, după exerciții musculare violente, după naștere, după administrarea unor hormoni (folicină, hormon paratiroidian, etc.) și patologice: în unele stări infecțioase, în leucemii (până la 1 000 000 globule albe pe mm³ sânge), în parazitoza intestinală.

Leucopenii pot fi provocate de frig, de foame, de unii hormoni (tiroxina, insulina), unele afecțiuni microbiene (febra tifoidă, rujeola, etc.).

Se crede că leucocitoza este reglată de un centru nervos mezocefalic prin intermediul ficatului.

Este de un mare interes, pentru stabilirea unui diagnostic, cunoașterea numărului de globule roșii, globule albe, a „formulei leucocitare". In

Fig. 139. Reţea de fibrină înglobând elementele figurate ale sângelui

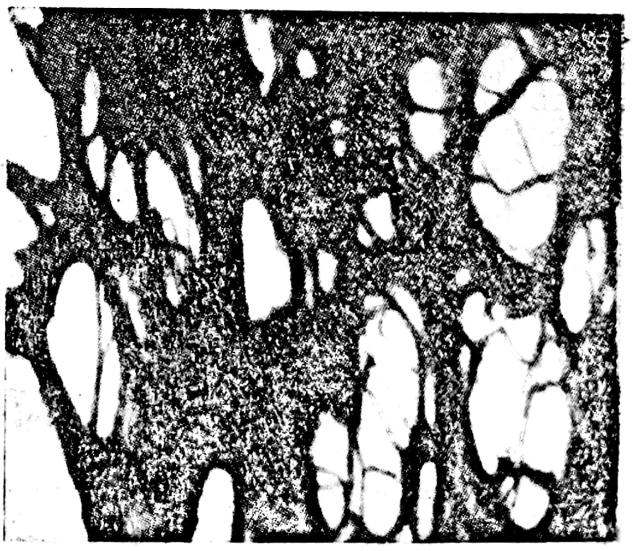
acest scop servesc hemocitometrele (hemocitometrul lui Thoma, lama Bürker, lama Türk), şi tehnicile de colorare speciale (de exemplu pentru trombocite metoda Kocher-Fonio).

COAGULAREA SÂNGELUI

Dacă se scoate sângele din vase, se gelifică spontan, luând forma unei masse gelatinoase; acest fenomen constitue *coagularea sângelui.* Procesul de coagulare constă în transformarea *fibrinogenului*, componenta proteinică solubilă, în *fibrină*, componentă insolubilă. Fibrina formează ace de aspect cristalin, care se înlănţue, dând o reţea.

In ochiurile reţelei formate din fibrină sunt aglomerate globulele albe şi roşii, precum şi plachetele, constituind aşa numitul chiag sanguin (fig. 139—140). Acest chiag, la câtva timp dela formare, eliberează un lichid clar, galben-pal, care constitue serul sanguin. Prin procesul de coagulare rezultă deci din plasma sanguină serul sanguin, care se deosebeşte de prima prin absenţa fibrinogenului. In ceeace priveşte celelalte componente chimice, deosebirile sunt destul de mici. Coagularea reprezintă un proces fiziologic fundamental de apărare împotriva hemoragiilor şi se produce ori de câte ori sângele e scos din vase. In unele cazuri de alterare a vaselor sanguine, încetinirea curentului sanguin poate provoca o coagulare chiar în vas: se produc tromboze care pot duce la embolii grave, mortale. Se poate împiedica sau întârzia coagularea sângelui scos din vase dacă se iau anumite precauţii, şi anume: 1) recoltarea lui în eprubete parafinate, 2) adăugarea de substanţe care precipită calciul (fluoruri, oxalat, citrat), 3) adăugarea unor substanţe cu acţiune anticoagulantă, ca heparina sau hirudina, al căror mecanism de acţiune este încă necunoscut. Procesul de coagulare implică un mecanism destul de complex, în care intervin o serie de factori, şi anume: *fibrinogenul* din plasmă, *ionii de calciu*, *protrombina* (trombogenul) şi *trombokinaza* (tromboplastina), care se găseşte în toate ţesuturile, dar în special în plachete sau trombocite.

Fig. 140. Reţea de fibrină după îndepărtarea elementelor figurate.

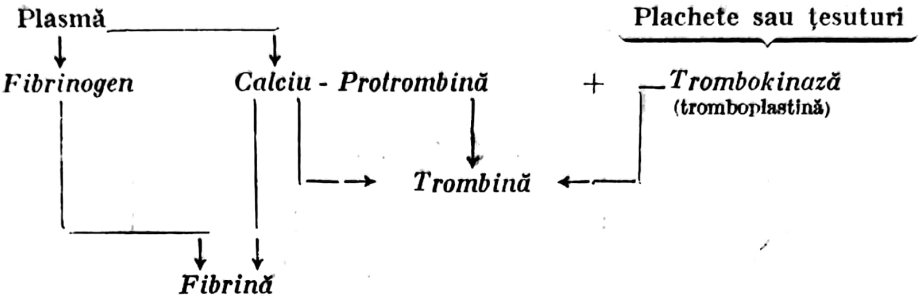


Scanned with OKEN Scanner

MECANISMUL COAGULĂRII

1. *Protrombina* sau *trombogenul* din plasmă este transformată în *trombină* sub acțiunea *trombokinazei* (tromboplastinei), din plachetele sanguine din țesuturi.

2. *Trombina acționează asupra fibrinogenului (solubil) și îl transformă în fibrină insolubilă*, care formează imediat un gel. Acesta înglobează elementele figurate din sânge (globule roșii, globule albe, plachete, etc.) și eliberează un lichid care constitue serul. Schema coagulării este următoarea :



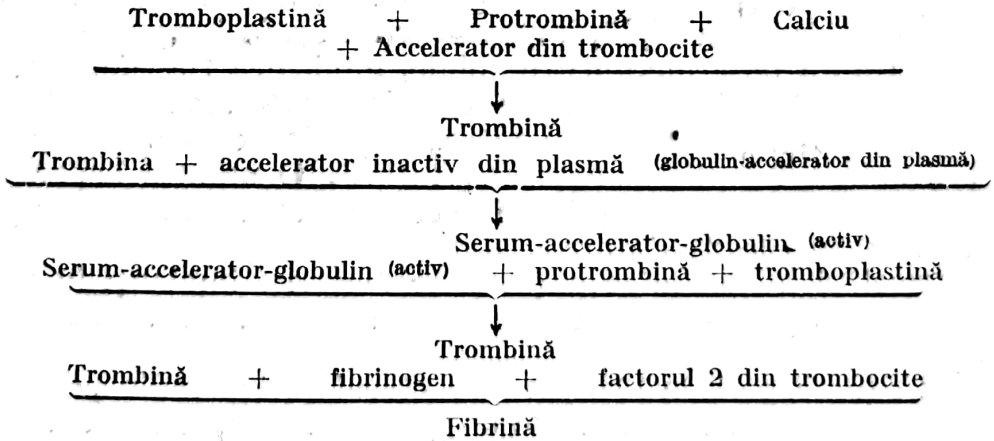
Această schemă e bazată pe o serie de fapte experimentale, și anume :

a. *Intervenția ionilor de Ca^{++} în procesul de coagulare a fost demonstrată prin faptul că aceiași reactivi care precipită calciul inhibă și coagularea* (oxalați, citrați, fluoruri). Dacă sângelui devenit incoagulabil prin adausul acestor substanțe i se adaugă calciu în exces, poate coagula.

b. Calciul nu are rol în formarea fibrinei, ci în formarea *trombinei* din *protrombină*, lucru care reiese din faptul că o trombină gata formată și eliberată total de calciu prin dializă rămâne totuși capabilă de a transforma fibrinogenul în fibrină. Trombina ar avea o acțiune de tip enzimatic, dar nici trombina și nici tromboplastina nu sunt enzime.

c. Trombokinaza nu are vreun rol direct în formarea fibrinei, ci intervine împreună cu calciul în transformarea protrombinei în trombină. O plasmă fără trombokinază, nu coagulează ; dacă i se adaugă însă extract de celule sau plachete, coagulează. Mecanismul intim al formării trombinei și fibrinei din protrombină, respectiv fibrinogen, este încă nelămurit.

Cercetările mai recente ar interpreta mecanismul coagulării în felul următor :

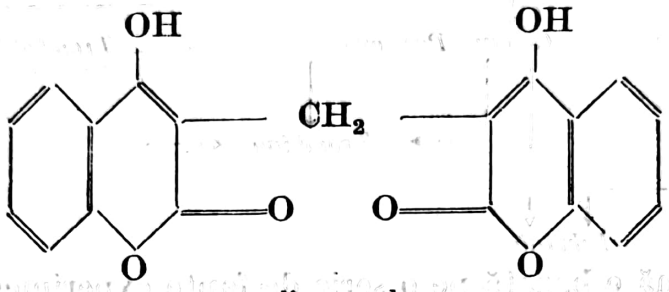


Interpretarea acestor transformări este încă de domeniul ipotezelor. Se pare că transformarea dela fibrinogen la fibrină ar fi o modificare de stare coloidală dela forma de sol la cea de gel sau o denaturare.

Scanned with OKEN Scanner

Trombina ar fi formată dintr'o combinare a calciu-protrombinei cu trombokinaza, constituind un complex de tipul enzimelor, în care apoenzima ar fi trombogenul, iar coenzima, trombokinaza.

Protrombina ar fi un glucoproteid format din două componente, *A* şi *B*, care ar fi combinate cu calciu. Oxalatul sau citratul precipită calciul din protrombină şi desface complexul. Componenta *A* dispare în sângele conservat, componenta *B* este stabilă şi poate fi adsorbită cu hidroxid de aluminiu. Această componentă este scăzută în avitaminoza K şi în intoxicaţiile cu dicumarol, substanţă cu puternică acţiune anticoagulantă, utilizată în clinică pentru prelungirea timpului de coagulare:



dicumarol

Pentru sinteza protrombinei este necesară prezenţa vitaminei K (care ştim că se găseşte în special în plantele verzi). Sinteza protrombinei în ficat este dependentă de vitamina K; o deficienţă hepatică duce la o scădere a protrombinei în sânge. Protrombina şi trombina sunt proteide conţinând glucide şi se găsesc în fracţiunea globulinică din sânge. Sunt distruse de acizi (pH=3,5) şi alcali (pH=11), prin încălzire 30′ la 60°; concentraţia protrombinei în sânge este de aproximativ 25 mg%. Se formează în ficat şi în mică măsură în măduva oaselor.

Fracţiunea albuminică din ser conţine un factor care neutralizează trombina.

Trombokinaza sau tromboplastina ar fi o substanţă de natură lipoidică care întovărăşeşte cefalina în ţesutul cerebral, unde se găseşte în special, dar cantitatea cea mai importantă provine din trombocite.

Sângele conţine o serie de factori care împiedică coagularea, ca de exemplu *heparina* (un acid mucoitinpolisulfuric), anticoagulant natural care ar avea o acţiune multiplă, împreună cu un cofactor prezent în albumina din ser; e un puternic antitrombinic, împiedică transformarea protrombinei în trombină, inhibă aglutinarea plachetelor. Acţiunea heparinei se exercită atât in vivo, cât şi in vitro. Heparina e utilizată în clinică pentru prevenirea trombozelor postoperatorii. O unitate heparină este definită ca fiind cantitatea care previne coagularea a 1 cc sânge păstrat la rece, în interval de 24 de ore.

Noile cercetări indică intervenţia unor factori stimulanţi în procesul de coagulare în afară de cei identificaţi anterior, şi anume factorii V şi VI.

Factorul V (descoperit în 1943) are caracterul unei globuline, este termolabil, solubil în apă şi are şi numele de „factor labil", factor accelerator-globulină (ac-globulină).

Factorul V, inactiv ca atare, este activat sub acţiunea unor cantităţi mici de *trombină*, devenind aşa numitul factor VI.

Scanned with OKEN Scanner

Factorul VI, împreună cu ionii de calciu şi trombokinaza (tromboplastina), transformă protrombina în trombină, conform reacţiilor :

$$\text{1. Protrombină} + \text{Factorul V} \xrightarrow[\text{Trombokinaza}]{+Ca^{++}} \text{Factorul VI}$$

$$\text{2. Protrombină} \xrightarrow{\text{Factorul VI} + Ca^{++}} \text{Trombină}$$

Factorul V ar avea astfel rolul unei proenzime care devine factorul activ enzimatic VI, care la rândul lui, transformă protrombina în trombină. Formarea fibrinei are loc ulterior prin acţiunea trombinei asupra fibrinogenului, ce trece prin etapa intermediară de profibrină.

Absenţa factorului V produce boala cunoscută sub numele de parahemofilie.

In timpul conservării sângelui, factorul V este componenta cea mai labilă, care, inactivându-se, aduce după sine prelungirea timpului de protrombină. Acest fapt indică un conţinut mai mic în protrombină în sângele hemofilicilor.

Dacă se iau în consideraţie factorii care intervin în procesul de coagulare, se pot distinge următoarele faze :

I. *Precoagularea*, în care intervin protrombokinaza din plasmă şi enzima plachetară, cu rezultat formarea trombokinazei active.

II. *Coagularea principală*, în care are loc transformarea profibrinei în fibrină sub acţiunea trombinei, formată la rândul ei sub acţiunea trombokinazei şi a factorului VI.

III. *Coagularea ulterioară* duce la retracţia chiagului. In procesul de coagulare intervin astfel o serie de factori stimulanţi ai coagulării : protrombina, calciul, factorul V, factorul VI, trombokinaza, trombina, fibrinogenul, fibrina. Pentru toţi aceşti factori pot exista inhibitori diverşi, ca de exemplu heparina, care are o acţiune antiprotrombinică, respectiv antitrombinică. După componenta proteinică cu care intră în combinaţie, heparina acţionează ca antitrombină sau antiprotrombină. Acţiunea antitrombinică a heparinei explică rolul ei anticoagulant.

Serumantitrombina inactivează, după realizarea coagulării, trombina, formată în exces, transformând-o în *metatrombină*.

Sângele conţine în mod normal un proferment numit profibrinolizină sau plasmină, respectiv *fibrinolizina*, sub formă inactivă, care în anumite condiţii poate fi transformată în enzimă activă de către un alt principiu din ţesuturi, *fibrinokinaza*.

Fibrinoliza, adică lizarea chiagului de fibrină, apare într'o serie de afecţiuni, în pneumonii, pericardite hemoragice, peritonite, şi este provocată de acţiunea unui ferment proteolitic.

Turburări ale coagulării sângelui

Timpul de coagulare normal este de 5—7; scurtarea lui este mai puţin frecventă şi fără semnificaţie clinică, cu excepţia posibilităţii unei tromboze, ca în febra tifoidă. Prelungirea timpului de coagulare e mai importantă, indicând o *hemofilie*, în care caz poate atinge o oră şi mai multe ore. Intârzierea timpului de coagulare poate avea cauze diverse şi se

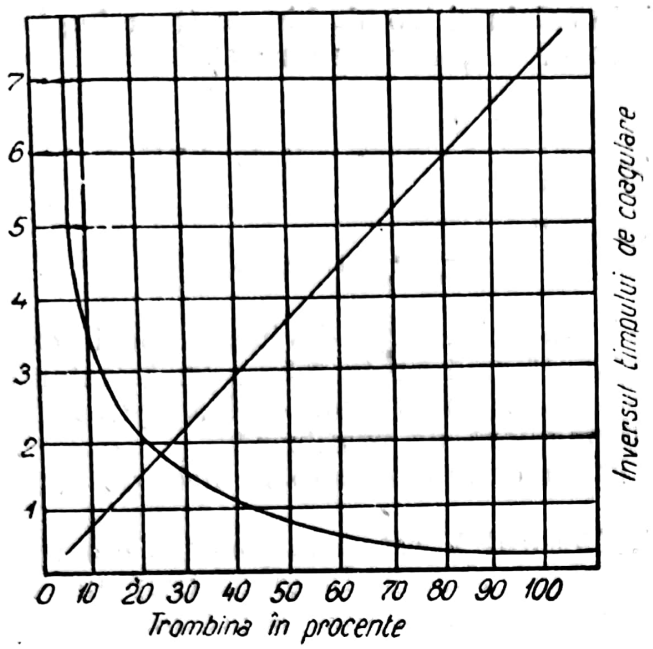


Fig. 141. Timpul de coagulare pentru fibrinogenul pur la concentrații variabile de trombină.

poate face o clasificare a acestora după diferitele mecanisme deficiente :

I. *Scăderea protrombinei.* Protrombopenie (datorită fie unei lipse în vitamina K, fie unei proaste utilizări a acesteia, fie unei toxine).

II. *Modificări în concentrația calciului.*

III. *Deficiențe în formarea tromboplastinei.*

IV. *Descreșterea cantității de fibrinogen.*

V. *Anticoagulanții din sânge.*

Când se analizează sângele total sau plasma sanguină e necesar să se prevină coagularea în mod artificial prin adăugare de substanțe anticoagulante. E de notat că acest coagulant salin poate modifica însă raportul de repartiție al substanțelor între globule și plasmă, deaceea în aceste cazuri se vor folosi anticoagulanți nesalini.

Heparina este un anticoagulanț foarte bun.

PROPRIETĂȚILE FIZICE ȘI COMPOZIȚIA CHIMICĂ A SÂNGELUI

Proprietățile fizice și compoziția chimică a sângelui variază după cum avem de a face cu *sângele total, globulele roșii, plasma sanguină* sau *serul sanguin.*

PROPRIETĂȚILE FIZICE ALE SÂNGELUI

Sângele este un lichid vîscos, roșu (sângele arterial e roșu-deschis, iar sângele venos e roșu-închis), care constitue aproximativ a patrusprezecea parte din greutatea totală a corpului uman.

Densitatea sângelui variază între 1,050—1,060 (în medie 1,055). Ea depinde în special de numărul globulelor roșii și de conținutul în hemoglobină.

Densitatea plasmei este de 1,023, a serului de 1,024.

Vîscozitatea sângelui total variază între 4,4—5,5 și este în funcție de numărul globulelor roșii și de conținutul în apă al sângelui. Variațiile patologice pot atinge limite considerabile, de exemplu 1,75 în cazuri de anemie, 25 în cazuri de eritremie. Variațiile vîscozității sanguine pot avea importanță în turburările circulatorii și unele stări de șoc.

Vîscozitatea plasmei poate varia între 1,7—2,1, a serului între 1,5—1,8. Ea este în funcție de proteinele din plasmă sau ser și de raportul dintre diversele fracțiuni proteinice.

Scanned with OKEN Scanner

Tensiunea superficială a sângelui variază între 55—77 dine pe cm². **Presiunea osmotică** este de 7 atmosfere., Δ *crioscopic* = — 0°56. **Presiunea coloidosmotică** e mică (1/25—1/30 atmosfere).

Conductibilitatea electrică depinde de concentrația ionilor și în special a ionilor $CO\ H^-$, Na^+ și Cl^-.

Indicele de refracție al plasmei este cuprins între 1,3487 și 1,3577; depinde în special de concentrația în săruri minerale și de concentrația în proteine. Sărurile minerale fiind în genere stabile, el va depinde în special de conținutul în proteine, fiind proporțional cu concentrația acestora. Determinarea acestui indice poate fi folosită ca o metodă clinică de determinare a proteinelor sanguine.

pH-ul în medie = 7,35, pentru sângele venos = 7,34, pentru sângele arterial = 7,36.

COMPOZIȚIA CHIMICĂ A SÂNGELUI

Sângele constitue calea de tranzit a metabolitelor, făcând legătura dintre diversele celule și organele digestive. Studiul va putea deci pune în evidență apariția unor compuși repetați dintr'o degradare anormală sau ivirea în cantități excesive sau scăzute a produselor metabolismului normal.

Factorii care pot influența compoziția chimică a sângelui pot fi de natură metabolică sau datoriți unei modificări a permeabilității membranelor organelor excretorii, plămân, rinichi, ficat.

Compoziția chimică a sângelui variază pentru diversele lui faze : sânge total, plasmă sanguină, ser sanguin sau globule roșii.

Componentele minerale

Tabelul 38

Constituenții anorganici din plasmă, globule roșii, sânge total

(valori exprimate în mg la 100 cc)

	Sodiu	Potasiu	Calciu	Magneziu	Clor	Iod	Fier	Cupru	Fosfat	Sulfat	Baze totale cc n/10 NaOH
Plasmă. . . .	340	20	10	2,70	370		0,2				160
Globule roșii .	20	410	0	6	190		100				
Sânge total. .	190	220	5,2	4	250	0,01	50	0,1	3	2	

Apa reprezintă cam 80% din sângele total; 65,8% din globule roșii, 91% din plasmă.

Repartiția elementelor minerale între globule și plasmă variază după elemente; astfel, $K^+ + Mg^{++}$ se găsesc în special în globule, Na^+ și Ca^{++} în plasmă. Ea este în funcție de permeabilitatea membranei globulului pentru aceste componente, permeabilitatea selectivă, la rândul ei, fiind în funcție de factori multipli chimici și fizico-chimici, încărcare electrică, acțiunea diverșilor ioni. Sângele conține anionii CO_3H^-, Cl^-, SO_4^{--}; PO_4^{---}; cationii K^+, Na^+, Ca^{++}; Mg^{++}.

Scanned with OKEN Scanner

Cantitatea de *calciu* este în medie de 10 mg la 100 cc ser ionizabil (4,25—5,25 mg%).

Calciul se găseşte în plasma sanguină sub trei forme: 1) ionizabil, 2) legat de coloizii plasmatici şi 3) neionizabil. In globule nu se găseşte calciu aproape deloc.

Sulful sanguin se găseşte aproximativ 0,140 g% sulf total sub formă de aminoacizi cu sulf, sulf oxidat corespunzător sulfaţilor minerali sau organici. Sulf neproteic = 7—10 mg%. Variaţii patologice ale raportului sulf neutru/sulf oxidat se găsesc în bolile pulmonare, pneumonie, pleurezie purulentă; în nefrite cronice creşte, atingând valori până la 20—37 mg%.

Clorul ,în sângele total, e de 2,95 $g^0/_{00}$; în globule =1,80 $g\ /_{00}$; în plasmă =3,60 $g^0/_{00}$. In clinică e important şi raportul clor globular/clor plasmatic, care în medie e egal cu 0,55 (0,50—0,60).

Valorile clorului globular şi plasmatic pot varia independent unul de altul, deaceea este importantă şi determinarea separată a acestora. Patologic, există hipercloremie globulară în nefrite adesea însoţită de cloropenie plasmatică şi de acidoză. Hipocloremia poate fi atât globulară, cât şi plasmatică, (vărsături repetate, diaree, ocluzie intestinală, diabet zaharat şi diabet insipid).

Iodul se găseşte în sânge în cantităţi foarte mici (12—14γ%). Sunt valori crescute în boala lui Basedow sau după medicaţie iodată prelungită. In mixedem şi cretinism, iodul scade.

Fosforul se găseşte sub forma de săruri minerale, ortofosfaţi şi sub formă de combinaţii organice (vezi tabelul 40). P total variază între 300—400 $mg^0/_{00}$.

Fosforul mineral variază între 3—3,4 mg% plasmă.

Tabelul 39

Compoziţia sângelui uman

Componente	mg % cc	Componente	mg % cc
Substanţe solide	19 — 23	Corpi cetonici totali	0,8— 5,0
Proteine totale (ser)	6,5 — 8,2	Acetonă — acid acetilacetic	0,3— 2,0
Albumine totale	4,6 — 6,7	Acid β-hidroxibutiric	0,5— 3,0
Globuline totale (ser)	1,2 — 2,3	Bilirubină	0,1— 0,25
Fibrinogen (plasmă)	0,3 — 0,6	CO_2 vol. % plasmă	55 — 75
Hemoglobină	15,6	CO_2 sânge arterial cc %	45 — 55
Fier (Fe)	52	CO_2 sânge venos „	50 — 60
Cupru	0,05— 0,25	O_2 sânge arterial „	15 — 23
Azot total	3,0 — 3,7	O_2 sânge venos cc%	10 — 8
Azot neproteic	25 — 35	Acid ascorbic	0,8— 2,4
Azot ureic	10 — 15	Acid lactic	5 — 20
Acid ureic	2,0 — 3,5	Fenoli liberi	1 — 2
Creatinină	1 — 2	Cloruri (NaCl)	450 —500
Creatină	3 — 7	Sulfaţi anorganici (S în ser)	0,9— 1,1
Azot aminic	5 — 8	Fosfor anorganic (P în plasmă)	3 — 4
Azot amoniacal	0,1 — 0,2	Calciu ser	9,0— 11,5
Azot nedeterminat	4 — 18	Magneziu (ser)	1 — 3
Glucoză	70 —100	Sodiu (ser)	330
Acizi graşi totali	290 —420	Potasiu (ser)	16 — 22
Colesterol	150 —190	Iod (γ la 100 cc)	8 — 15
Fosfor lipidic	12 — 14		

Scanned with OKEN Scanner

Fosforul organic se găseşte sub formă de esteri fosforici, fosfor lipidic şi fosfor nucleoproteidic, etc. Esteri fosforici sunt de exempu esterul difosfogliceric, hexofosfaţii, glicerofosfaţii, adenozintrifosfaţii. Fosforul lipidic se găseşte în lecitine, cefaline, sfingomieline. Fosforul anorganic este distribuit în mod egal în plasmă şi globule. Fosforul organic este de aproape 10 ori mai mult decât cel mineral (35—40 mg%)

Esterii fosforici şi fosforul anorganic se determină în sânge după precipitarea proteinelor cu acid triclor acetic şi constitue „fosforul acidosolubil".

Esterii fosforici se determină din diferenţa dintre fosforul acidosolubil şi fosforul mineral.

Fosforul lipidic se determină în extractul cu alcooleter.

Tabelul 40

P în sângele total	
mg % cc	
P total	40
P total acidosolubil	27
P anorganic (în globule şi plasmă)	3
Esteri fosforici (în special în globule)	24
P lipidic (în globule şi plasmă)	13

Gazele din sânge

Gazele din sânge provin din aerul atmosferic. Compoziţia aerului inspirat este : 21% O_2, 78% N_2, 1% argon, 0,03 — 0,04% CO_2, urme de CO, H_2, gaze sau neon, heliu, kripton, xenon.

Modificările suferite de aer în plămân

Aerul expirat conţine 16,4% O_2, 41% CO_2.

Compoziţia aerului alveolar, 14,5% O_2, tensiune 103,4mm Hg. 5,5% CO_2, corespunzător unei tensiuni de 39,2 mm Hg vapori de apă.

Compoziţia gazelor din sânge :

Sânge arterial : 20 cc O_2, tensiune 80 mm Hg ; 43 cc CO_2, tensiune 15—30 mm Hg.

Sânge venos : 12—14 cc O_2, tensiune 26—40 mm Hg ; 50—60 cc CO_2, tensiune 15—30 mm Hg.

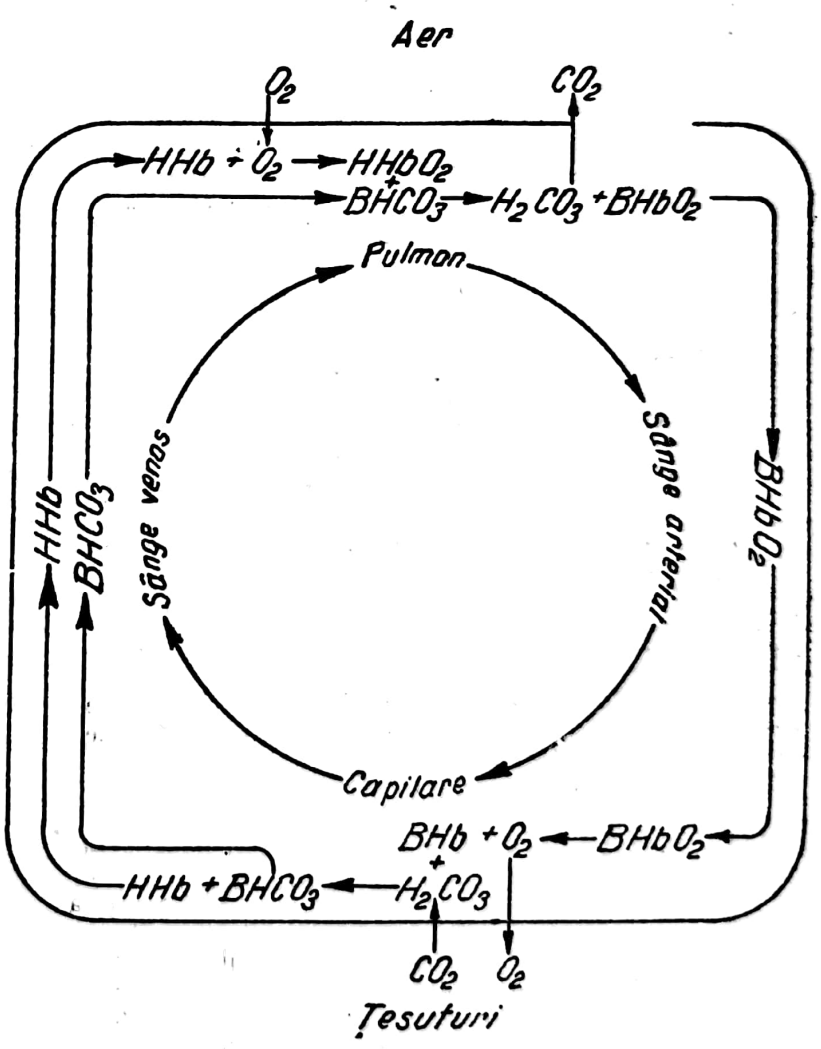
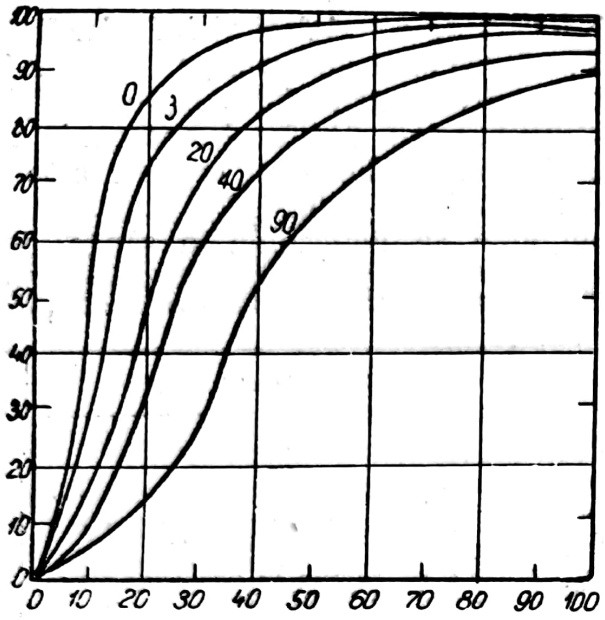


Fig. 142. Diagrama care arată rolul oxigenului în transportul CO_2 în sânge



In abscisă presiunea O_2

Fig. 143. Curbele de disociaţie ale hemoglobinei din sângele uman expus la presiuni de 0 - 3 - 20 - 40 şi 90 m CO_2.

Componentele organice

Componentele organice din sânge sunt: *azotate* şi *neazotate*. In grupa componentelor azotate intră: *protidele*, care constitue cam 85% din totalul substanţelor solide, apoi *ureea*, *aminoacizii*, *polipeptidele*, *glutationul*, *creatina*, *creatinina*, *acidul uric*, *indoxilul*.

Componentele lipidice cuprind: *lipidele complexe*, *colesterolul*. *Glucidele din sânge sunt constituite în special din glucoză*.

Constituenţii azotaţi neproteinici din sânge se determină după îndepărtarea proteinelor cu defecanţii lor specifici (vezi tabelul 41).

Tabelul 41

Azotul neproteic
(valori exprimate în mg %)

	Globule roşii	*Plasmă*
N total neproteic	39—61	20—36
N ureic	12—22	13—23
N aminoacizi	8—11	5—8
Acid uric	1—4	2—5
Creatină	4—8	0
Creatinină	1,6—3	1—1,5

Azotul total neproteic reprezintă N din uree, acid uric, creatină, creatinină, aminoacizi; este determinat după desalbuminare cu acid tricloracetic şi dozat prin metoda Kjeldahl; variază între *20—36 mg% cc* plasmă. Are valori crescute în afecţiunile renale.

Azotul rezidual reprezintă diferenţa dintre azotul total neproteic şi azotul *din uree*; variază între 10—20 mg%; are valori crescute în afecţiunile renale.

Proteinele plasmatice

Proteinele plasmatice sunt constituite dintr'un amestec de diverse tipuri de proteine, având proprietăţi chimice şi fizico-chimice diferite, şi anume: 1) *fibrinogen*, 2) *globuline*, 3) *albumine*, 4) *nucleoproteine* şi în cantitate mică 5) *sermucoide*.

Proteinele totale reprezintă cam 6—8 g% cc plasmă.

Fibrinogenul se găseşte în plasma sanguină în concentraţie de aproximativ 0,34—0,4 g% cc plasmă. Se mai găseşte în limfă, chil, precum

Scanned with OKEN Scanner

și în unele exudate și transudate. Fibrinogenul din plasma umană are o greutate moleculară de 500 000; proteină liniară = 900 Å lungime, 33 Å lărgime; raportul axelor = 1 :30; are o structură fibrilară; este insolubil în apă, solubil în soluții saline diluate, ușor precipitabil de săruri în soluții concentrate, soluție saturată de ClNa. Coagulează la 56°. Are caracteristica specială de a putea fi transformat într'o componentă insolubilă, *fibrina*, sub acțiunea trombinei, proces chimic care este la baza fenomenului de coagulare sanguină. Prin procesul de coagulare se separă din plasma sanguină serul sanguin care nu mai conține fibrinogen și care are deci un conținut în proteine mai mic decât al plasmei.

Fibrinogenul a fost preparat sub formă cristalizată. Are caracterele generale ale unei globuline. Este format probabil în ficat (sub influența vitaminei K), unde se și depozitează. Afecțiuni hepatice grave produc o scădere a fibrinogenului. Scade deasemenea în bolile infecțioase.

Albuminele cuprind fracțiuni din proteinele plasmatice care reprezintă aproximativ 4,5—5,5 g%. Albumina din serul uman are o greutate moleculară de 70 000—75 000 și un pH izoelectric de 5,4. Sunt solubile în apă pură. Fracțiunea albuminică din plasmă este relativ omogenă. S'a reușit să se obțină albumine serice sub formă cristalizată. Se admite că sediul de formare al albuminelor serice este ficatul (celulele Kupffer). Scad în bolile hepatice.

Globulinele sunt insolubile în apă pură. Globulinele plasmatice reprezintă cam 1,5—3,5%, sunt un amestec de proteine ce se deosebesc între ele prin solubilitate diferită în amestecuri saline, precum și prin proprietăți fizico-chimice diferite. Se deosebesc două grupe mari de globuline plasmatice, și anume: *euglobulinele* și *pseudoglobulinele*. Euglobulinele sunt insolubile în apa lipsită de săruri; pseudoglobulinele sunt solubile. Cu ajutorul noilor tehnici, în special cu aceea fizico-chimică a electroforezei, s'au putut diferența în aceste grupe o serie de subgrupe: α, β, γ, pseudo- și euglobuline; γ-globulinele, la rândul lor se împart în alte subgrupe.

Fracționarea proteinelor plasmatice

Pentru a cunoaște natura chimică și rolul fiziologic al fiecărei proteine din plasmă, precum și variațiile lor patologice, este necesară o separare, o fracționare, a acestor proteine individuale.

Metodele de separare se bazează în special pe diferențele fizico-chimice care există între diversele tipuri de proteine. Ele sunt:

1. *diferențe de solubilitate în soluții apoase, în soluții saline concentrate sau în diverși solvenți organici* (alcool de diverse concentrații);
2. *diferențe în viteza de sedimentare*, folosind ultracentrifuga;
3. *diferențe în viteza de migrare în câmpul electric* (electroforeza).

Separarea cu ajutorul sărurilor. Solubilitatea diferită în soluții saline a fracțiunilor proteinice din ser este folosită ca o metodă curentă de dozare și diferențiere a acestor fracțiuni. Sărurile neutre folosite pentru precipitarea fracționată sunt NaCl, SO_4Mg, SO_4Na_2, SO_3Na, $SO_4(NH_4)_2$. La pH și temperatură constantă, logaritmul solubilității (exprimată în grame la 1 cc) pentru o proteină pură este o funcție liniară de concentrație salină a mediului de disolvare.

Cu NaCl, fibrinogenul precipită în soluție 1/2 saturată. Euglobulinele precipită la saturare totală. Albuminele nu precipită.

Scanned with OKEN Scanner

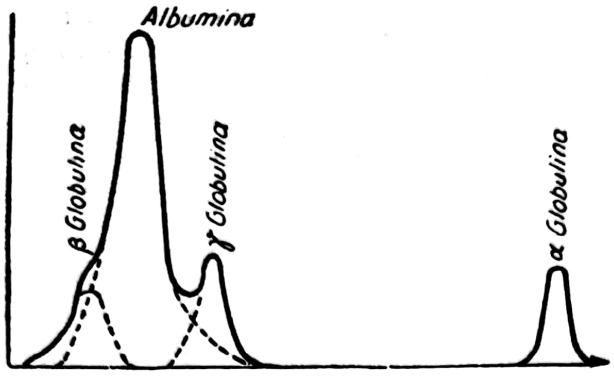


Fig. 144. Diagrama de sedimentare a proteinelor plasmatice la ultracentrifugă.

Cu $SO_4(NH_4)_2$, fibrinogenul precipită la 15—27% saturare, euglobulinele la 28—38% saturare, pseudoglobulinele la 35 — 44% saturare, albuminele la saturare totală. La 34% saturare precipită în special γ-globulina şi 1/3 euglobulinele care precipită la dializă. La 40% saturare cu $SO_4(NH_4)_2$, fracţiunea este compusă din α şi β-globuline, o parte γ-globulină şi o treime euglobulină. La 50% se obţine un precipitat care nu mai conţine γ-globuline, dar conţine atât α- cât şi β-globuline.

Sărurile cele mai frecvent folosite pentru determinarea fracţiunilor proteinice sunt sulfatul de amoniu şi sulfatul de sodiu. Cu cât concentraţia salină creşte, cu atât precipită mai multe fracţiuni proteinice din ser. Fibrinogenul este cel mai puţin solubil, urmează euglobulina, pseudoglobulina şi albumina, care este cea mai solubilă.

Se pot realiza precipitări fracţionate ale proteinelor plasmatice cu alcoolul etilic la temperaturi sub 0° (—5° Cohen).

Separarea cu ajutorul ultracentrifugării. Se folosesc ultracentrifuge care au un câmp centrifugal de 900 000 ori mai intens decât al gravitaţiei (Svedberg). Centrifugarea se face în celule închise, prevăzute cu geam, prin care se pot lua fotografii chiar în timpul centrifugărilor. Se determină indicele de refracţie corespunzător fiecărei pături de separaţie dintre componente şi mediul de disolvare, folosind o metodă optică. Se înregistrează deplasarea optică a unei gradaţii de pe o scară, deplasarea fiind proporţională cu gradientul indicelui de refracţie ($Z=\frac{dn}{dx}$, unde x este distanţa faţă de axa de rotaţie). Prin măsurători microfotometrice se obţin diagrame de sedimentare. In soluţii conţinând o singură proteină, deci o singură componentă dispersată, gradientul indicelui de refracţie prezintă un singur maxim (vezi diagrama fig. 144). Acest maxim este cu atât mai apropiat de centrul de rotaţie cu cât particulele sunt mai uşoare şi greutatea moleculară a proteinei mai mică. Când sunt în soluţie mai multe proteine, vor fi atâtea maxime câte particule de dimensiuni diferite se găsesc în amestec. Analiza matematică a acestor diagrame duce la o serie de curbe, fiecare exprimând sedimentarea unei singure componente, a cărei concentraţie se poate calcula prin determinarea ariei subiacente, respectiv prin integrare.

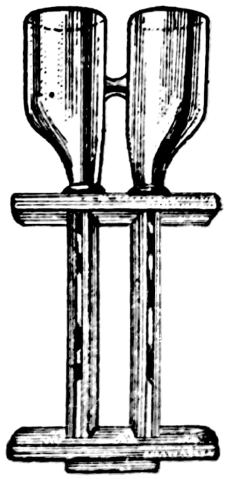


Fig. 145. Tip de celulă pentru electroforeză.

Separarea cu ajutorul electroforezei. Metoda care a lămurit în mare măsură compoziţia proteinică a plasmei şi a serului sanguin este metoda electroforezei, iniţiată de Tiselius. Această metodă foloseşte diferenţele în încărcarea electrică a diverselor fracţiuni proteinice ca o me-

todă de separare şi diferenţiere a acestor fracţiuni. Dacă se introduce plasma sau serul în porţiunea mediană a unui tub electroforetic în U (fig. 145), iar în braţele laterale soluţie tampon de un anumit pH şi se aplică la capetele tubului un curent electric de un anumit voltaj, proteinele din plasmă sau ser vor migra spre polul electric de semn contrar. Viteza de migrare fiind proporţională cu mărimea încărcării electrice a particulei (pentru un pH anumit, o anumită temperatură şi o anumită cădere de potenţial), diversele fracţiuni proteinice cu încărcări electrice diferite vor migra cu viteze diferite, astfel că de-a-lungul tubului în U se vor crea linii de demarcaţie între aceste fracţiuni. Se face o distribuţie în timp a diverselor fracţiuni proteinice în raport cu viteza lor de migrare. Distribuţia poate fi urmărită cu ajutorul unor sisteme optice speciale şi înregistrată fotografic. Metodele optice de înregistrare sunt metoda strielor a lui Toepler modificată de Longsworth, şi metoda refractometrică a lui Lamm modificată de Phlipott şi Svensson.

Cu metoda strielor se pot stabili diagrame în care fiecare limită de separaţie apare ca o bandă întunecată; imaginea va cuprinde atâtea benzi întunecate câţi constituenţi de încărcare diferită sunt în sistem. Metoda a fost transformată într'o metodă cantitativă cu ajutorul unei modificări introduse de Longsworth. Fracţiunea proteinică cu încărcare electrică mai mare şi mai uşoară, şi anume ionul albumină, va migra cel mai repede, globulinele mai încet.

Prin modificarea concentraţiilor soluţiilor de proteine se modifică indicele de refracţie al mediului şi cu ajutorul metodelor optice bazate pe această proprietate se pot urmări şi înregistra migraţiile fracţiunilor, ceeace permite diferenţierea componentelor cu viteze de migrare diferite şi chiar determinarea lor cantitativă.

Se stabilesc astfel imagini electroforetice care arată componenţa proteinică a plasmei şi a serurilor normale şi patologice (fig. 146 şi 147).

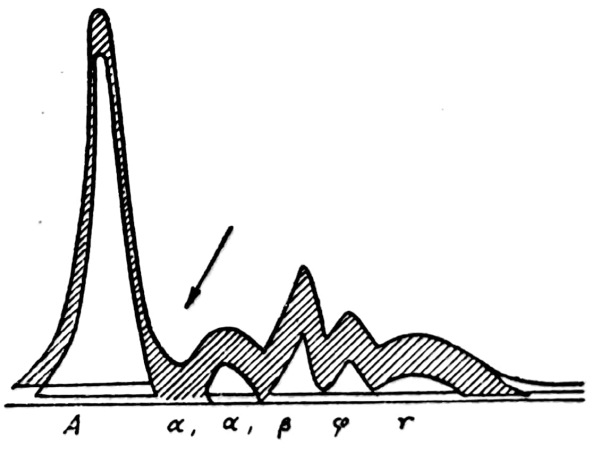
Tiselius a arătat că plasma normală conţine cel puţin 5 componente electroforetic identificabile, şi anume, fibrinogenul, albumina şi trei globuline pe care le notează cu α, β şi γ, având viteze de migrare diferite.

Viteza cea mai mare de migrare aparţine fracţiunii albuminice care are o moleculă mai mică. α, β şi γ-globulinele au viteze mult mai mari de migrare; dintre acestea, α-globulina are viteza cea mai mare şi -globulina cea mai mică.

α-globulina are pH izoelectric = 5,1; β-globulina = 5,6 şi γ-globulina = 6.

Cercetări ulterioare au arătat că cele trei fracţiuni globulinice precum şi fracţiunea albuminică pot fi separate în subfracţiuni prin modificarea pH-ului, duratei de electroforeză, etc. Ele au fost notate cu α_1, α_2, şi β_1, β_2-globuline.

Se pune problema dacă diversele fracţiuni izolate sunt



A = albumine α_1; α_2; β; γ = globuline φ = fibrinogen

Fig. 146. Diagrama electroforetică a proteinelor plasmatice

într'adevăr entităţi chimice distincte sau produse artificial ale metodelor de cercetare. Totuşi, fracţionarea proteinelor plasmatice cu ajutorul sărurilor şi controlul ulterior al acestor fracţiuni cu ajutorul electroforezei indică următoarele fracţiuni controlate chimic şi biologic :

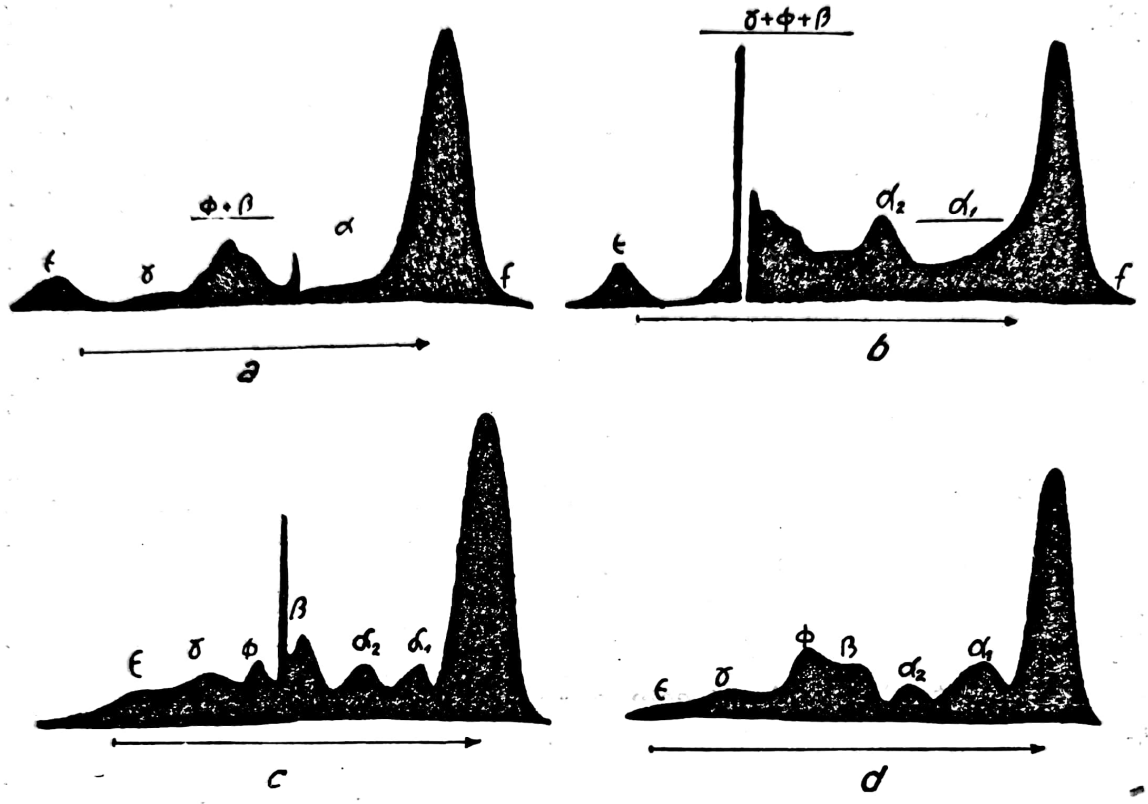


Fig. 147. Imagini electroforetice ale plasmei aparţinând diverselor animale

fracţiunea I conţinând 61% fibrinogen, enzima fibrinolitică şi factorul hemofilic ;

fracţiunea II, conţinând 98% γ-globuline, are funcţie de imunoglobulină;

fracţiunea III_1 conţinând 35% β-globuline şi 61% γ-globuline, are funcţie de izohemoaglutinină ;

fracţiunea III_2 conţinând 10% α-globuline, 75% β-globuline şi 15% γ-globuline, are funcţie de complement şi de trombină.

Fracţiunile II şi *III* conţin şi factorul anti R_h ;

fracţiunea IV conţine 55% α-globuline, 28% β-globuline ; are activitatea hipertensinogenului şi aceea de complement ;

fracţiunea IV_3 conţine hormonul tireotrop ;

fracţiunea V_1 conţine hormonul folicular.

fracţiunile II, III_1 şi III_2, purtătoare de anticorpi, sunt folosite în scop terapeutic în diferitele boli infecţioase.

Din fracţiunea I s'au izolat produse folosite în chirurgie, ca fibrina (filmul de fibrină), în tratamentul arsurilor, şi spuma de fibrină, pentru hemostază.

Metoda electroforezei permite şi o determinare cantitativă a diverselor fracţiuni. Ea indică următoarele valori exprimate în grame la 100 cc plasmă citratată (vezi tabelul 42).

Tabelul 42

Valorile obținute prin electroforeză		Valorile obținute prin precipitare cu sulfat de sodiu	
Proteine totale	6,03—6,72%		6—8
Albumine	3,32—4,04		4,3—5
Globuline totale	2,23—2,29		1,1—3,1
α-globuline	0,79—0,84	Euglobuline	0,1—0,4
β-globuline	0,78—0,81	Pseudoglobuline	1,0—2,7
γ-globuline	0,66—0,70		
Fibrinogenul	0,34—0,44	Fibrinogen	0,2—0,3

Raportul albumină/globulină = 1. Raportul albumină/globuline = 1,50.

Există controverse încă dacă între fracțiunile proteinice izolate cu ajutorul sărurilor și fracțiunile obținute electroforetic există identitate. Fracțiunea precipitată la 34% saturare în sulfat de amoniu constă în special din γ-globuline și o treime euglobulină. La 40% saturare fracțiunea constă din α- și β-globulină și o mică parte γ-globulină (și aceasta conține o treime euglobulină). Creșterea saturației la 50% precipită o fracțiune care nu mai conține γ-globulină, ci α și β-globulină, deci rezultatele nu s'ar suprapune în aceste condiții. Pseudoglobulina conține 85% α-globulină și 15% γ-globulină.

Euglobina conține mai mult β și γ-globuline și mai puțin α-globuline.

Fracționarea serului uman cu metanol 42,5% la O° și pH 6,7—6,9 dă valori apropiate de cele electroforetice.

Diversele fracțiuni electroforetice conțin fracțiuni lipidice și glucidice; albumina conține bilirubină.

Metoda electroforetică aplicată studiului proteinelor plasmatice este importantă în urmărirea variațiilor acestor componente în diverse boli și în stabilirea unor diagnostice.

Variațiile patologice ale proteinelor plasmatice

sunt frecvente. Poate varia conținutul total al proteinelor, dar diversele fracțiuni proteinice pot varia fără ca acest conținut total să se modifice.

Fibrinogenul crește în sarcină, menstruație, în leziuni diverse, în malarie, în infecțiile acute. Scade în afecțiuni hepatice.

Proteinele totale sunt scăzute în hemoragii, în arsurile extensive.

Albuminele sunt scăzute în ciroza hepatică, în hepatitele cronice, infecțiile cronice, în foamea proteinică. O consecință a scăderii albuminelor este scăderea presiunii osmotice, deci o reducere a volumului plasmatic. Ca efect de compensare cresc globulinele.

γ-globulinele cresc în ciroză hepatică, mielom multiplu, leucemie, tuberculoză, hepatită acută, nefrită acută, infecție cronică.

Anticorpii din serurile imune ar fi identice cu γ-globulina sau fixați de fracțiunea γ-globulinică.

Se înțelege prin disproteinemie, modificarea raporturilor cantitative ale fracțiunilor proteinice, iar sub numele de *paraproteinemie*, apariția de proteine atipice în plasmă (în mielom, nefroze, etc.).

Hipoproteinemii apar în infecții cronice, limfogranulom inguinal, endocardite lente, infecții cronice. In plasma sanguină a bolnavilor cu

Scanned with OKEN Scanner

deficienţe ale parenchimului hepatic s'a constatat prezenţa unor globuline atipice cu tendinţă la cristalizare spontană, conţinând tirozină. In mielom s'a constatat deasemenea apariţia unei globuline cu greutate moleculară foarte mare (1 000 000).

Origina proteinelor plasmatice

Se consideră în general ficatul ca fiind locul de formare al proteinelor plasmatice, dar şi alte organe pot realiza acest proces. Se admite că ficatul este locul de formare al fracţiunii albuminice şi al fibrinogenului. In alterări ale ţesutului hepatic (toxice), fibrinogenul din sânge scade, dar revine la normal în urma regenerării ficatului.

Dacă se face unui animal o exsanguinare şi i se introduce în circulaţie sânge defibrinat, nivelul fibrinogenului revine în câteva ore la normal; la un animal hepatectomizat însă, acest lucru nu are loc. Origina globulinelor din ser nu este încă lămurită. Se pare că ficatul nu are aici un rol important; ele ar deriva din limfocite. Date experimentale ar indica un rol al hormonului adrenocorticotrop în formarea a 30% din β şi γ globuline; şi 70—80% din γ-globuline.

Una din tehnicile cele mai bune pentru studiul experimental al formării proteinelor plasmatice este aceea a „*plasmaferezei*" în care se exanguinează un animal; elementele figurate din acest sânge sunt apoi resuspendate într'o soluţie izotonică oarecare, liberă de proteine şi sistemul este reintrodus în circulaţia animalului; se controlează apoi reformarea proteinelor în condiţii experimentale variabile. Astfel, s'a constatat că nivelul proteinic al plasmei la un câine în experienţă se poate menţine numai prin administrarea intravenoasă a unui amestec de aminoacizi, şi anume, a acelora indispensabili din alimentaţia şobolanilor tineri, în creştere.

Proteinele plasmatice sunt într'un continuu schimb metabolic cu proteinele şi aminoacizii din organism. Acest lucru a fost confirmat cu ajutorul izotopilor. S'a constatat că aşa zisa viaţă medie a proteinelor e de aproximativ 2 săptămâni. Deci proteinele sunt într'un echilibru dinamic perpetuu în organism.

Funcţiile proteinelor plasmatice

Proteinele plasmatice au funcţii multiple: nutritive şi fizico-chimice. Proteinele plasmatice sunt într'adevăr metabolizate în organism, deoarece, introduse în circulaţie, dispar după câtva timp.

Funcţiile fizico-chimice sunt foarte importante.

1. Menţin volumul normal al sângelui şi al conţinutului în apă al organismului. Datorită structurii lor coloidale şi presiunii lor coloidosmotice menţin echilibrul în schimburile dintre capilare şi ţesuturi. Din cauza structurii lor coloidale mari nu difuzează prin peretele capilarelor şi exercită o presiune osmotică ce tinde să menţină o cantitate fixă de apă în sânge. Aceasta este presiunea coloidosmotică sau oncotică. Ea are o valoare de aproximativ 25—30 mm Hg. Dintre componentele proteinice, albumina are rolul cel mai important. Ei îi revin cam 80% din presiunea osmotică a proteinelor totale datorită moleculei ei mai mici (70 000—75 000) decât a globulinelor (150 000—190 000) şi concentraţiei ei mai mare în sânge. Un gram albumină poate reţine cam 20 cc apă în sânge.

Scanned with OKEN Scanner

O pierdere de proteine plasmatice şi în special de albumine plasmatice ar fi o cauză a simptomelor care întovărăşesc o serie de turburări, ca de exemplu şocurile hemoragice. Deaceea se recomandă în acest caz aport exterior de proteine plasmatice şi în special de albumine plasmatice.

Presiunii coloidosmotice a proteinelor plasmatice i se opune presiunea sanguină care tinde să ducă apa şi substanţele solubile prin membranele capilare în ţesuturi. In mod normal, între aceste două forţe contrare există un echilibru. Dacă acest echilibru este modificat de anumite cauze, de exemplu, un conţinut redus în proteine plasmatice sau creşterea permeabilităţii pereţilor capilarelor faţă de proteine, are loc o acumulare excesivă de apă în ţesuturi, deci edem. Aşa dar, un deficit de proteine plasmatice poate fi o cauză de edem care poate fi înlăturat prin aport de proteine.

2. O altă funcţie fizico-chimică a proteinelor plasmatice este menţinerea echilibrului acido-bazic datorită rolului lor amfoter.

3. Au rol în realizarea unui mediu protector pentru globulele roşii; favorizează mobilitatea acestora.

4. Fracţiunile globulinice ar fi suportul anticorpilor, în special γ-globulinele. In bolile infecţioase acestea au valori crescute. Izoaglutininele A şi B sunt prezente în fracţiunile β şi γ-globulinice.

5. Constitue o rezervă proteinică atunci când aportul proteic scade.

Componentele azotate neproteice din sânge

Componentele azotate neproteice din sânge se determină după îndepărtarea proteinelor cu precipitanţii proteinici adecuaţi, în special cu acidul tungstic (format prin introducerea în ser de tungstat de sodiu şi acid sulfuric).

Azotul neproteic din sânge include azotul din constituenţii azotaţi neproteici şi anume azotul ureic, din acidul uric, din creatină, din creatinină, din amoniac (vezi tabelul 43). Dintre acestea, azotul ureic reprezintă majoritatea azotului neproteic. Azotul neproteic din sânge variază între 25—35 mg% şi are valori crescute în nefrite, în hipertrofia prostatică, în ocluzia intestinală acută, etc.

Tabelul 43

		sau în procente	
Azot total	0,31 ‰	N total	100
Azot ureic	0,14 „	N ureic	45,1
Azot aminat	0,07 „	N aminat	22,5
Azot creatinic	0,018 „	N creatinic	5,8
Azot uric	0,013 „	N uric	4,2
Nedozabil	0,049 „	N nedozabil	16

Azotul ureic în sângele total variază între 10—15 mg%. In nefrite poate creşte la 30—40 mg, deasemenea în bolile asociate cu o alterare a funcţiei renale. Concentraţia din sânge are o semnificaţie mai importantă dacă este corelată cu excreţia ureei în urină, fapt care se aplică în probele funcţionale. Ureea este, la om, produsul final al catabolismului aminoacizilor, fiind sintetizată, după cum am văzut, în ficat din amoniacul rezultat din aminoacizi. Producerea ei face parte din sintezele numite de excreţie. Ureea este foarte puţin toxică.

Scanned with OKEN Scanner

Acidul uric este, la om, produsul final al catabolismului purinelor. In sânge se găseşte 99% sub formă de urat monosodic, restul sub formă de acid uric liber. In sângele total variază între 2—3 mg%, în globulele roşii 1—3 mg%, în plasmă 3—5 mg%.

Excreţia acidului uric în urină se face în urma concentrării în rinichi a unui ultrafiltrat al plasmei sanguine. Astfel se explică dece acidul uric sanguin creşte în bolile renale. In nefritele incipiente se citează valori între 3—10 mg%, în nefrite avansate până la 25 mg%. Acidul uric sanguin creşte în gută, în artrite, în leucemii (distrugere a componentelor nucleare), în intoxicaţii acute cu mercur. Creşterea acidului uric în sânge poate astfel indica fie o deficienţă în metabolismul nucleoproteinic, fie o insuficienţă renală. Acest din urmă fapt este important şi poate fi datorit unei cauze circulatorii (deficienţă cardiacă), unei cauze mecanice (adenom prostatic), unei leziuni renale (nefrite). Hiperuricemia constitue astfel un simptom precoce al retenţiei azotate. Origina acidului uric fiind exogenă şi endogenă, alimentaţia trebue astfel aleasă încât, în cazul unei uricemii crescute, aportul exogen să fie minim. Alimentaţia gutoşilor trebue să fie lipsită de compuşi purinici şi e bine să conţină un exces de baze fixe care transformă acidul uric în uraţi, mai uşor solubili.

Creatina şi creatinina. Creatina sau acidul metilguanidinacetic se găseşte în sânge în concentraţie de 3—7 mg% sânge total. Creatina din sânge se găseşte la adult în special în globulele roşii. La copii şi în sarcină se găseşte în cantitate mică în plasmă (0,4—0,8 mg%). Nu se pot corela variaţii importante ale creatinei cu anumite stări patologice. Poate varia în afecţiuni renale acute (ablaţia rinichiului, intoxicaţii cu mercur). In anurie creşte mult, deasemenea în leziuni musculare grave.

Prezenţa în sânge a *creatininei* totale (anhidrida internă a creatinei) nu este influenţată de variaţii fiziologice. Este cel mai fix constituent al sângelui. Variaţiile patologice ale creatininemiei dau unele indicaţii diagnostice şi prognostice ale azotemiei (în nefritele cronice). In genere, însă, creşterea conţinutului în creatinină este mai tardivă decât a celorlalte componente azotate.

Aminoacizii. Conţinutul în aminoacizi din sângele total variază între 5—8 mg% în plasmă 4—5 mg%, în ser, ceva mai crescut. S'au constatat valori crescute în nefritele uremice, în leucemii, în atrofia hepatică acută. Insulina reduce cantitatea de aminoacizi din sânge.

Azotul polipeptidic se găseşte în cantităţi mai mari în globule (0,14 g‰) decât în plasmă (0,03—0,04 g). El provine din degradarea incomplectă a proteinelor, în care deci nu se ajunge la produsele finale, aminoacizi şi uree. In leziuni renale, în arsuri grave şi în şocul operator, valorile N polipeptidic sunt crescute.

Glutationul, dintre polipeptide, se găseşte numai în globule (0,35—0,45‰). Apar variaţii importante în afecţiuni hepatice şi în cancer.

Componentele neazotate din sânge

Zahărul sanguin

Este forma de transport prin care glicogenul hepatic este trecut celulelor. Valoarea normală a glicemiei este 70—120 mg% cc sânge total. Din acesta, probabil 20—30 mg% corespund altor substanţe neglucidice din sânge (aşa numitele substanţe „zaharoide"). O cantitate mică de

zahăr sanguin este „legată" de molecula proteică — așa numitul zahăr protidic. Între sângele arterial și cel periferic există mici diferențe. Difuzarea zahărului între globule și plasmă are loc imediat și duce la stabilirea unui echilibru.

Sângele are o acțiune glicolitică spontană; in vitro, în 24—48 de ore, sângele distruge până la 1,50 g la $^0/_{00}$ glucoză proprie sau adăugată sub acțiunea unei enzime prezente în globulele albe. In urma glicolizei apar acid lactic (două molecule acid lactic pentru fiecare moleculă de glucoză) și fosfor anorganic — ceeace implică un compus fosforat al glucozei. Pentru a evita această fermentație lactică spontană se utilizează ca anticoagulant clorură de sodiu (1—2 g la $^0/_{00}$) care inhibă glicoliza; în acelaș scop este necesară păstrarea serului la o temperatură scăzută.

Zahărul din sânge este sub formă dializabilă, deci liber; este o dextroză și anume după unii α-sau β-glucopiranioză, după alții o glucofuranoză. Glicemia este crescută în diabet, și anume: în cazurile mai puțin grave valorile pot fi între 140—300 mg%; în diabetul sever au fost notate și valori peste 1 200 mg%. Hiperglicemia apare și în nefrite grave, în turburări hepatice. Experimental se produce hiperglicemie după injecții cu adrenalină. Supraalimentația glucidică poate duce la hiperglicemie. Creșterea glicemiei depinde de natura zahărului ingerat. Din cele trei monozaharide (glucoza, fructoza, galactoza), aceasta din urmă produce creșterea cea mai mare, ceeace se explică prin faptul că galactoza este cel mai repede absorbită în tractul intestinal (fructoza cel mai lent). Variațiile glicemiei în raport cu alimentația glucidică au făcut pe clinicieni să stabilească *un test al toleranței la glucide*, care constă în următoarele. Se determină glicemia la intervale de 30′ după ingestia de 1 g glucoză pe kilocorp, deasemenea se determină glucoza urinară pentru un interval de 24 de ore. Se constată la normal o creștere a glicemiei în primele 30′, respectiv 60′, când atinge 100—150 mg%; apoi glicemia scade treptat, după o oră și jumătate revine la normal și după trei ore scade cam cu 20% sub valoarea normală. Este ceeace se numește o hipoglicemie tardivă, datorită probabil unei hipersecreții insulinice provocată de hiperglicemia inițială. Glicozuria se instalează la indivizii normali numai pentru valori ale glicemiei care depășesc 160—200 mg%, cifră care corespunde pragului renal de eliminare. Apariția de glucoză în urină la glicemii sub aceste cifre e datorită fie unei toleranțe micșorate pentru zahăr, fie unei creșteri a permeabilității renale, pentru zahăr.

Dăm trei exemple care să evidențieze mersul curbei hiperglicemiei alimentare la normali și la doi indivizi cu toleranță pentru glucoză alterată (vezi tabelul 44).

Tabelul 44

G $^0/_{00}$	Cazul I		Cazul II		Cazul III	
Valori inițiale	sânge 0,8	urină absentă	sânge 1,0	urină absentă	sânge 0,8	urină absentă
$^1/_2$ oră . .	1,3	—	1,5	absentă	1,1	prezentă
1 oră . .	1,1	—	2,0	prezentă	1,0	prezentă
2 ore . .	0,8	—	2,2	prezentă	0,9	prezentă
3 ore	0,7	—	1,6	prezentă	0,8	prezentă

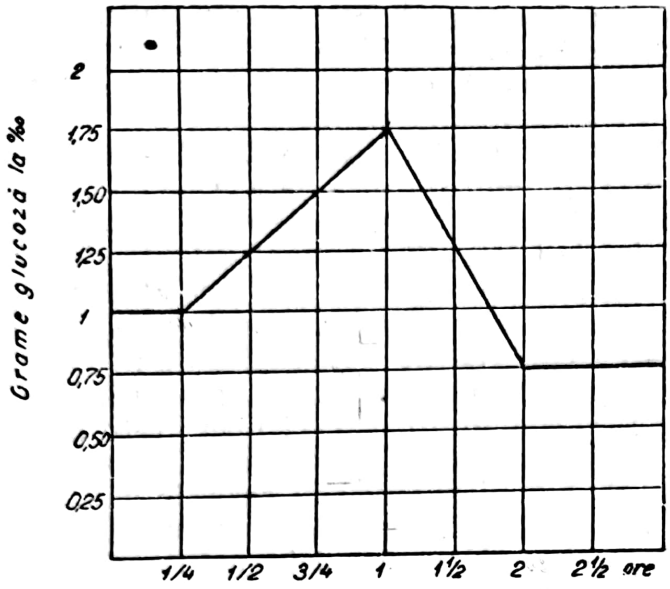


Fig. 148. Curba hiperglicemiei

Cazul I intră în seria cazurilor normale.

In urma ingestiei de glucoză are loc o creştere a glicemiei care atinge un maxim după ½ oră, apoi scade. După 2 ore revine la normal, iar după 3 ore scade puţin sub normal. In acest caz, creşterea glicemiei nu aduce după sine apariţia glucozei în urină.

Cazul II. Maximul hiperglicemiei alimentare e atins abia după 2 ore, iar apariţia glucozei în urină are loc pentru valorile mai mari de 2 $g^0/_{00}$.

In acest caz există o toleranţă scăzută pentru zahăr, dar o permeabilitate normală.

Cazul III. Maximul e atins după ½ oră, deci normal, şi valoarea e în limite normale, în schimb în urină apare zahăr pentru toate valorile glicemiei, chiar pentru cele normale. In acest caz există o toleranţă crescută pentru zahăr şi o permeabilitate crescută renală, *o creştere deci a pragului de eliminare prin rinichi.*

In afară de alimentele glucidice, hiperglicemia poate fi provocată şi de ingerarea unor alimente protidice, desigur în cantităţi mult mai mari. Curba hiperglicemiei alimentare are aspectul din fig. 148.

In afară de alimentaţie, alţi factori externi care influenţează glicemia sunt: frigul, emoţiile, efortul muscular, diverşi ioni calciu sub formă de $CaCl_2$ duc la hiperglicemie, ionii de potasiu la hipoglicemie. Hiperglicemia întovărăşeşte adesea diverse stări patologice, nefrite, hipertensiuni, etc. Deci, cauze multiple fiziologice şi patologice tind să modifice nivelul normal al zahărului sanguin. Există însă în organism un mecanism reglator care menţine în mod normal acest nivel la valoarea sa normală.

Lipidele din sânge

Lipidele sanguine se găsesc sub formă liberă şi legată. Lipidele libere se găsesc sub formă de picături de grăsime — în special după ingerare de grăsimi — şi dau serului un aspect lactescent.

Lipidele „legate" de proteinele sângelui, globuline, albumine, formează cenapse lipido-proteice.

Cenapsele lipido proteice din ser

Macheboeuf numeşte *cenapse*, orice produs biologic care rezultă din unirea prin anumite forţe a doi sau mai mulţi constituenţi ai materiei vii, unire care modifică proprietăţile constituenţilor.

Lipidele de rezervă sunt sub formă de picături vizibile, uşor colorabile cu oxidul de osmiu sau Sudan III. Lipidele celulare sau lipidele constitutive nu se pot pune în evidenţă prin aceeaşi metodă şi nu sunt extractibile în eter prin contactul direct cu celulele, ceeace indică faptul

că aceste lipide sunt înglobate într'un complex cu anumite constituente celulare care maschează proprietăţile lor caracteristice. Într'adevăr, prin degradarea proteinelor cu enzime proteolitice se pot pune în evidenţă aceste lipide cu reactivii lor caracteristici. Acest fapt a făcut să se admită existenţa unor combinaţii lipidoproteidice în constituţia protoplasmei.

In serul şi plasma sanguină există asemenea compuşi lipidoproteici ; astfel, serul de cal conţine 6 grame la 1000 cc ser substanţe lipoidice diverse. Serul ca atare, agitat cu eter, nu eliberează însă decât 1 la 100 lipide. Acest fapt indică existenţa lipidelor mascate prin combinaţia lor cu alte componente serice sau plasmatice. Prin separarea electroforetică a celor 54 fracţiuni proteice din serul uman, albuminele, globulinele α, β şi γ, se constată că aceste fracţiuni conţin lipide, şi anume, valorile sunt redate în tabelul 45.

Tabelul 45

Lipide % substanţă uscată	
Albumine	3,3
Globuline α	11,7
Globuline β	18,6
Globuline γ	1,4

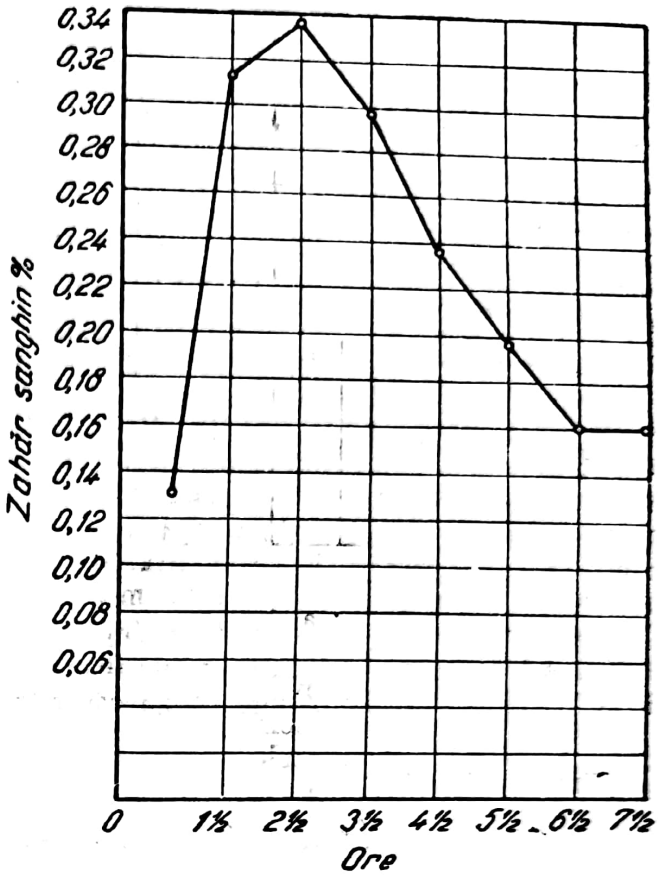


Fig. 149. Curba glicemiei la un diabetic după ingestie de glucoză

Deasemenea se constată prezenţa unor glucide legate de proteine (deci *cenapse glucido-proteice*), ceeace arată că proporţia de substanţe neproteice în aceste fracţiuni este destul de mare ; de exemplu, globulinele β conţin mai mult de 25 % substanţe neproteice, de care sunt atât de strâns legate încât nu se pot separa nici electroforetic.

Complexul lipido-proteic este stabil în soluţie apoasă, spre deosebire de lipidele ca atare, care nu dau soluţii apoase stabile. Este posibil ca *funcţiile apolare din molecula proteinelor (fracţiunea polimetilenică a leucinei, valinei, alaninei, ciclul fenilalaninei, etc.) să se unească cu funcţiile apolare din molecula lipidelor (prin forţe de solvatare, forţe Van der Waals, etc), funcţiile polare ale proteinelor CNH_2, — COOH, — SH, — CO, — NH, etc. sau chiar ale lipidelor, orientându-se spre periferia complexului şi menţinând întregul complex în soluţie cu toată fracţiunea destul de importantă apolară şi, deci, fără afinitate cu solventul.*

Dacă această ipoteză este justă, ar trebui ca lipidele să poată fi deplasate — pe baza acţiunii legii masselor — de către substanţe cu structură chimică vecină cu a lor ; într'adevăr prin acţiunea săpunurilor hidrosolubile şi a eterului, săpunul ia locul lipidului, formând cenapsa, proteidă-săpun, iar lipidul trece în eter. In felul acesta, săpunul desface cam 75 % din lipidele din ser. Delipidarea cenapselor lipido-proteice se poate face cu săpunuri cationice sau anionice deasemenea, saponozidele (saponinele heterozide hidrosolubile al căror aglicon are un nucleu analog nucleului ciclopentanofenantrenic al colesterolului) deplasează colesterolul şi eterii colesterolului din ser şi fac posibilă trecerea lor în eter.

Importanţa biologică a cenapselor lipido-proteice din ser este destul de mare, şi anume, aceste complexe intervin într'o serie de fenomene imunologice şi, în special, au un rol în reacţiile de punere în evidenţă a anticorpilor în vitro, reacţiile de floculare toxină-antitoxină, reacţia Bordet-Wassermann, precipitările antigen-anticorp, etc. Cenapsele lipido-proteice ar juca un rol în schimburile de apă şi de săruri dintre sânge şi ţesuturi, după cum arată lucrările asupra nefrozei lipoidice.

In sânge se găsesc *gliceride, acizi graşi, fosfatide, colesterol (liber şi sub formă de esteri)*. Dăm un tabel al valorilor acestor componente (vezi tabelul 46).

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 46

	Plasmă	Eritrocite	Sânge total	(valori exprimate în mg %)
Lipide totale	570—820	—	—	
Gliceride	0—200	0—150	0—160	
Acizi graşi	190—420	280—450	290—410	
Lecitine	175—330	325—575	250—410	
Colesterol total	100—230	100—230	100—230	
Colesterol liber	30—60	aproape totalitatea colesterolului e liber	—	
Colesterol sub formă de esteri	40—70	aproape absent	—	

Se vede că sunt mai multe gliceride în plasmă decât în eritrocite, mai mulţi acizi graşi în eritrocite şi mai multe lecitine. Colesterolul este egal repartizat între globule şi plasmă, dar în plasmă este sub formă liberă şi esterificată, în globule numai sub formă liberă. Colesterolul din ser e crescut în nefroze, lipemie, diabet, hipotiroidism, obstrucţii ale căilor biliare. Este scăzut în anemia megaloblastică, biermeriană, hipertiroidism, în unele afecţiuni hepatice. Lipidele totale cresc sub influenţa directă a alimentaţiei, în sarcină, în unele insuficienţe renale, în diabetul zaharat, în hipotiroidism. In sânge se găsesc *săpunuri* (0,20—0,30 g la 100 cc).

Pigmenţii biliari

Bilirubinemia normală în ser este de 0,1—0,25 mg la 100 cc sau, în unităţi (1 unitate = 0,5 mg%), 0,2—0,5 unităţi. Ea poate creşte în urma unei distrugeri exagerate de globule roşii, deci datorită unor factori de natură hemolitică sau datorită unor turburări de eliminare la nivelul ficatului. Valori scăzute pot să existe în anemiile secundare. Determinarea bilirubinei este astfel importantă în diagnosticul diferenţial al anemiilor. Pragul renal de eliminare este pentru valori ale bilirubiniei din plasmă cuprinse între 3,5—4 unităţi (1,7—2 mg%).

Bilirubina se pune în evidenţă cu reactivul diazoic al lui Ehrlich, acid sulfanilic diazotat, folosit de Van den Bergh, cu care formează un compus colorat cunoscut sub numele de azorubin sau azobilirubin. Reactivul poate folosi la dozarea cantitativă a bilirubinei şi la diferenţierea calitativă a bilirubinei sanguine. Van den Bergh constată că bilirubina din ser poate să dea cu acest derivat diazoic o coloraţie *imediată*, este aşa numita „reacţie directă" sau mai *tardivă*, abia după îndepărtarea proteinelor serice cu alcool; în acest caz reacţia are numele de *reacţie indirectă*. Van den Bergh socoate că aceste diferenţe sunt dependente de calea prin care pigmentul ajunge în ser. In general, bilirubina care vine din regiuni de formare extrahepatică este legată de globulină şi dă „reacţia indirectă".

Reacţia directă se găseşte în general în icterele prin obstrucţe ale căilor biliare, când căile biliare sunt blocate, împiedicând excreţia pigmenţilor biliari secretaţi de către ficat şi în icterele hepatice.

Reacţia este indirectă şi bilirubinemia mult crescută în icterele hemolitice, unde din cauza hemolizei exagerate se produce o cantitate mare de bilirubină extrahepatică, acelaş lucru în anemia megaloblastică biermeriană.

Scanned with OKEN Scanner

Reacţia directă este pozitivă în ictere mecanice provocate prin obstrucţia căilor biliare (calculi, neoplasm), în distrugerile mari de parenchim hepatic (atrofie galbenă acută a ficatului, intoxicaţii cu fosfor, hepatite grave). Bilirubina indirectă nu trece în urină şi deaceea în icterul hemolitic nu apare bilirubină în urină.

Bilirubina în ser este legată de albumină, formând o cenapsă albumino-bilirubinică.

Dacă se compară conţinutul în bilirubină al urinii, plasmei şi ultrafiltratului plasmei, la un câine cu legătură a coledocului, deci icteric, bilirubinuria ar fi datorită următorului mecanism : în prima fază rinichiul scindează complexul albumină-bilirubină, în a doua fază fracţiunea de bilirubină eliberată, este concentrată şi ulterior eliminată în urină.

Sângele mai conţine *acid ascorbic* (0,01 $g^0/_{00}$), *vitamine azotate* (aneurina, lactoflavina, amida nicotinică în cantităţi foarte mici), *indoxil* (câteva zecimi de miligram la litru), *fenoli*, proveniţi fie din alimentaţie, fie din medicamente, şi mai ales din fermentaţiile intestinale.

LIMFA

Limfa şi lichidele tisulare provin din plasma sanguină prin exudare din capilarele sanguine. Compoziţia chimică a acestora este analoagă din punct de vedere calitativ cu aceea a plasmei, diferă de aceasta din punct de vedere cantitativ.

Limfa are un conţinut în apă de 94—95%, o greutate specifică de 1,016—1,023, pH=7,34 (limfa cervicală), rezerva alcalină la fel cu a sângelui. Repartiţia electrolitelor între globule şi plasmă este dirijată de un echilibru Donnan. Din punct de vedere calitativ, limfa are aceleaşi proteine ca şi plasma sanguină, dar în cantitate mai redusă (2,5—4,5%). Conţinutul în proteine nu este acelaş în tot sistemul limfatic. De exemplu : concentraţia este mai mare în limfa toracică decât în cea periferică.

In limfă se găseşte fibrinogen (cu valori mai scăzute) şi toţi factorii care duc la transformarea fibrinogenului în fibrină, dar chiagul este foarte puţin retractil, conţine fibrinogen, protrombină, leucocite şi coagulează mai lent decât sângele.

Limfa conţine albumină şi (α, β, γ) globuline, cantitatea de albumină fiind mai mare, iar raportul albumină/globulină fiind de 3—4. Aspectul figurii cataforetice este mai simplu decât al serului.

Compoziţia limfei variază cu alimentaţia şi este în funcţie de regiunea corespunzătoare din corp. Iată de exemplu compoziţia chimică a unei limfe din vena limfatică (vezi tabelul 47).

Tabelul 47

Apă	94,07 %
Reziduu fix	5,9030 %
Proteine totale	3,8030 %
Grăsimi	0,2200 %
Glucide	1,2800 %
Na	0,3310 %
K	0,0171 „
Ca	0,0116 „
Cl	0,382 „

Substanţele care stimulează formaţia limfei, numite limfagoge, sunt : ureea, glucidele, extractele de organe, diversele săruri, proteinele.

Limfa intestinală, care conţine o cantitate mare de grăsimi (5—15%) poartă numele de *chil*. In timpul digestiei, chilul devine lactescent din cauza bogăţiei sale în lipide.

Rolul limfei este în primul rând acela de a transporta materialele nutritive.

In afară de limfă, medii interioare specializate mai sunt: lichidul cefalorahidian, umoarea apoasă şi vitroasă a ochiului, endo- şi perilimfa urechii interne.

LICHIDUL CEFALORAHIDIAN

Lichidul cefalorahidian este un lichid clar, incolor, ca apa. Funcţia lichidului cefalorahidian este aceea de a apăra celula nervoasă. Intre celula nervoasă şi lichidul cefalorahidian există un schimb metabolic permanent. Se credea la un moment dat că lichidul cefalorahidian ar fi un ultrafiltrat al plasmei sanguine. Cercetări ulterioare au arătat că celulele plexului coroid sunt acelea care îl formează.

Densitatea lichidului cefalorahidian este cuprinsă între 1,002—1,008; punctul crioscopic $\Delta = -0°$, 565, deci egal cu al plasmei sanguine; tensiunea superficială 72,0 dine la 20°; indicele refractometric: 1,33516.

In lichidul cefalorahidian se găsesc aproape toate componentele prezente în plasma sanguină, dar în concentraţii mai reduse (ureea, glucoza, acidul lactic, sărurile minerale, etc.). Nu conţine nici fibrină, nici fibrinogen.

Compoziţia chimică a lichidului cefalorahidian este dată în tabelul 48.

Tabelul 48

Valori exprimate în mg la 100 cc lichid cefalorahidian

		mg %		mg %
Reziduu sec	săruri minerale	882 } 1 g	ClNa	720—750
	materii organice	118 }	Cl K	40
Proteine	Albumină	22	Fosfor anorganic	1,25—2,0
	Globulină	6,7	Bicarbonat(în vol. CO_2 %)	40—60
Aminoacizi		1,5—3,0	Na	325
Creatinină		0,45—2,20	K	12—17
Acid uric		0,5 —2,8	Mg	3—3,6
Lipide	Colesterol	0,11	Ca	4,0—7,0
	Acizi graşi	4,38	Acid lactic	13—68
	Fosfatide	0,95	pH	7,35—7,40
Glucoză		65—80		
Uree		20—25		

Variaţiile ureei sanguine se reflectă şi în valorile ureei din lichidul cefalorahidian. Deasemenea glicorahia creşte proporţional cu glicemia, cu excepţia cazului când intervin enzime glicolitice în lichidul cefalorahidian. In meningita septică, scăderea glucozei în lichidul cefalorahidian nu este însoţită de hipoglicemie. In encefalita epidemică, creşterea zahărului sanguin este proporţională cu creşterea glicorahiei, astfel că raportul $\frac{\text{glicorahie}}{\text{glicemie}}$ este constant.

Lichidul cefalorahidian este un lichid sărac în substanţe proteice. Raportul albumină/globulină = 3. In unele afecţiuni ale sistemului nervos (paralizie generală, meningită), albuminorahia are valori crescute.

MEDIILE OCHIULUI

Globul ocular este format din trei pături concentrice — o pătură externă, fibroasă, sclerotică, întreruptă în partea anterioară de o pătură transparentă, corneea. A doua pătură e coroidă, membrana conjunctivă impregnată cu un pigment, probabil o melanină, pigmentul coroidian. A treia pătură este retina, formată din fibre conjunctive care reţin terminaţiile nervoase ale nervului optic şi celulele retiniene, bastonaşele şi conurile. Bastonaşele şi conurile sunt receptorii vizuali şi sunt orânduiţi cu axa lor perpendicular pe suprafaţa retiniană. Numărul receptorilor în retina umană este de 115 000 000 bastonaşe şi 6 500 000 conuri. Bastonaşele conţin un pigment roşietic, purpura vizuală sau rodopsina. Lungimile de undă (λ) ale energiei radiante care stimulează retina sunt cuprinse între 400 milimicroni ($m\mu$) şi 780 $m\mu$ (spectru vizibil) (4 000—7 800 Angströmi) (1 Angström $= 1 \times 10^{-8}$ $m\mu$). Corneea transmite radiaţii între $\lambda = 295$ $m\mu$ — $\lambda = 2\,500$ $m\mu$, maximul de transmisie fiind la aproximativ 1 000 $m\mu$. Mediile lichide, transparente ale ochiului, sunt : umoarea apoasă şi umoarea vitroasă. Toate razele cu lungimi de undă peste $\lambda = 2\,700$ $m\mu$ sunt absorbite de umoarea apoasă, iar razele cu valori ale lui λ peste 1 600 $m\mu$ sunt absorbite de umoarea vitroasă. Cantitatea de energie luminoasă necesară pentru a stimula retina nu este constantă pentru toate lungimile de undă ale spectrului vizibil.

Mecanismul fotochimic al vederii este determinat de prezenţa pigmentului fotosensibil, *rodopsina* sau purpura vizuală, existent în bastonaşele retiniene. Am văzut că rodopsina este un complex proteic cuplat cu un carotenoid care constitue gruparea cromoforă şi care poate fi extras din retină cu soluţii de săruri biliare şi în special cu digitonină.

Se crede că aproximativ zece grupări cromofore sunt fixate la fiecare suport proteinic. Proteina ar fi legată şi cu fosfolipide. Greutatea moleculară a purpurei vizuale ar fi variabilă, având valori între 100 000—800 000.

Purpura vizuală este decolorată de lumină pentru lungimile de undă cuprinse între 385 şi 600 $m\mu$, maximul de decolorare fiind la 502 $m\mu$, iar pigmentul este regenerat la întuneric. Asupra structurii chimice a rodopsinei s'a insistat la capitolul vitaminelor în legătură cu vitamia **A**, cu care am văzut că are legătură structurală.

Purpura vizuală decolorată de lumină trece întâi într'o culoare portocalie („portocaliu tranzitor") care, descompunându-se, devine repede galbenă („indicator galben") şi apoi incoloră. Rodopsina, în timpul decolorării, este desfăcută în proteină şi pigmentul carotenoid, numit retinen. Retinenul se poate extrage cu cloroform, are o bandă de absorbţie în cloroform la 385 $m\mu$ şi în triclorură de antimoniu la 564 $m\mu$. Retinenul însuşi este legat de o proteină şi se descompune în vitamina A şi proteină (retinenul ar fi de fapt aldehida vitaminei A); produsul final, incolor, este vitamina. Retina este bogată în vitamină A, dar, în condiţii fiziologice, nu are loc o acumulare a acestei vitamine, iar lipsa de vitamină A am văzut că duce la hemeralopie. Regenerarea rodopsinei are loc în retină în timpul adaptării la întuneric şi în prezenţa vitaminei A.

Relaţia de transformare între rodopsină şi vitamina A este următoarea :

rodopsină $\rightleftarrows$ retinen + proteină

$\downarrow$ $\downarrow$

vitamină A + proteină

Teoria fotochimică a vederii crepusculare nu explică însă vederea în timpul zilei.

Mediul de refracţie al ochiului

este constituit din : cornee, umoare apoasă, cristalin şi umoare vitroasă. Au următorii indici de refracţie : corneea 1,37, umoarea apoasă 1,33, cristalinul 1,42, umoarea vitroasă 1,33.

Cristalinul constitue aparatul optic care permite acomodarea ; conţine 65% apă şi 33,5% protide. Au fost identificate patru tipuri de proteine : o euglobulină, „albuminoidul", (17%) insolubilă în apă, două proteine solubile în apă, pseudoglobulinele : -cristalinul (11%) şi β-cristalinul (6%) bogate în sulf (cistină—cisteină) şi o mică cantitate de albumină (0,2%), coagulată la 80°. Proteina din cristalin este organospecifică, nu speciospecifică. Cristalinul e bogat în potasiu (400 mg% grame substanţă umedă), conţine calciu 5 mg%, NaCl 300 mg%, are concentraţia salină totală 0,7—0,8% conţine colesterol şi fosfatide 200 mg%.

In cristalin există un sistem autooxidabil format din glutation. Intre glutation şi β-cristalin există un echilibru oxidoreductor de tipul $2-SH \rightleftarrows -S-S-$, care ar juca un rol important în respiraţia cristalinului. Structura cristalinului se modifică cu vârsta şi în anumite cazuri patologice, ca de exemplu în cataractă. In această afecţiune are loc o coagulare progresivă a proteinelor cristalinului. Cristalinul cataractat are un conţinut mai mare în cenuşă decât cristalinul normal, valorile crescute ale calciului variind în funcţie de evoluţia bolii. Raportul :

$$\frac{Ca\,\%\ din\ cristalinul\ normal}{Ca\,\%\ din\ cristalinul\ contractat}$$ are valori între 4,6 şi 21.

Scade conţinutul în K iar raportul $\frac{K\,\%\ din\ cristalinul\ normal}{K\,\%\ din\ cristalinul\ contractat}$ variază între 0,065—0,080

Deasemenea, s'au constatat creşteri marcate ale potenţialului de oxido-reducere (+166 mv faţă de + 93 mv din cazurile normale).

In cristalinul normal s'a pus în evidenţă prezenţa vitaminei C şi variaţiile înregistrate în cazurile de cataractă s'au corelat cu această carenţă vitaminică.

Cristalinul este lipsit de vase sanguine şi îşi primeşte hrana dela lichidele care îi umectează suprafaţa, şi anume, dela lichidele intraoculare, umoarea vitroasă şi umoarea apoasă.

Umoarea apoasă este un fluid clar, transparent. Ocupă camera anterioară şi posterioară a ochiului, între cornee şi iris şi cristalin.

Are pH = 7,1—7,3 ; greutatea specifică = 1002—1004.

Vîscozitatea = 1029 .< = — 0,565 — 0,600°.

Are următoarea compoziţie (vezi tabelul 49)

Tabelul 49

Apă	99,69 g% umoare apoasă	Glucide	0,098
Reziduu uscat	1,0869 „ „ „	Grăsimi	0,004
Proteine totale	0,0201	Na	0,34
Albumine	0,0123	K	0,021
Globuline	0,0078	Ca	0,0072
Fibrinogen	—	Mg	0,0026
N neproteic	0,0236	Cl	0,437
Uree	0,028	P anorganic	0,0033
Aminoacizi	0,029	S anorganic	0,0061
Creatinină	0,002		

Scanned with OKEN Scanner

In ceeace privește deosebirile față de ser, cele mai marcate sunt în privința proteinelor și lipidelor, pe când substanțele difuzabile sunt în general în aceleași concentrații.

In legătură cu formarea lichidelor intraoculare din plasma sanguină, există mai multe teorii : a *dializei*, a *filtrației* și a *secreției*. Teoria dializei pare să fie cea justă și e dirijată de un echilibru Donnan, cel puțin în ceeace privește ionii Na^+, K^+, $Cl.^-$

Umoarea vitroasă, situată în corpul vitros, cuprins între retină și fața posterioară a cristalinului, conține apă 98,50%, protide 0,16%, NaCl 1,42% și o substanță din grupa mucinelor, din clasa „hialomucoidelor", vitrema; are indicele de refracție 1,33, pH-ul 7,6 și rH-ul 19,1. Are structura unui gel. Sărurile acidului carbonic constitue singurul tampon al corpului vitros și se pare că alcaloza și acidoza sanguină influențează corpul vitros. Are putere absorbantă în lumina ultravioletă, grație substanțelor proteice pe care le conține.

MEDIILE URECHII INTERNE

Urechea internă conține perilimfa și endolimfa. Endolimfa este un lichid clar, fluid ca apa, incolor la adult (roșietic la făt), cu pH-ul = 7,36.

Perilimfa este un lichid vîscos, bogat în mucine și cu pH-ul = 7,41. Fiecare din aceste lichide are origină diferită, și anume perilimfa provine din lichidul cerebrospinal, iar origina endolimfei este necunoscută.

In endolimfă se găsesc otolitele sau pudra auditivă, otoconiile, concrețiuni calcaroase, în compoziția cărora intră CO_3Ca (73,80%), CO_3Mg (1,20%) și substanțe organice 25%.

SIMȚURILE CHIMICE

Simțul gustativ și simțul olfactiv răspund la stimulenți chimici și în acest sens se pot numi simțuri chimice. Substanțele care trezesc senzație gustativă trebue să fie disolvate într'un lichid oarecare sau în salivă.

Organul gustativ la om este situat în special pe limbă și diferențiază patru senzații gustative de bază : dulce, acru, sărat, amar, din combinația cărora pot rezulta senzații gustative diferite, ca de exemplu cea alcalină, sau metalică.

Există o strânsă legătură între senzațiile gustative și constituția chimică a substanțelor ingerate.

Senzația de dulce este dată în special de compuși organici : zaharuri (zaharoza, maltoza, glucoza, unele polizaharide, etc.), alcooli, aldehide și cetone ale seriei alifatice, zaharina, dulcina și cloroformul. Există și unele substanțe minerale care dau senzația de dulce, ca acetatul de plumb, alcalii în diluții mari. S'a pus în legătură senzația de dulce cu prezența unui anumit radical sau atom din moleculă, presupunând că fiecare moleculă ar conține o *grupare glucoforă* și o *grupare auxogluca*, din combinarea cărora rezultă un compus ce provoacă senzația de dulce :

1) grupările $-CO-CHOH-(h)$
2) „ $-COOH-CH.NH_2$
3) „ $-CHOH-CHOH$
4) „ $-CH-O-NO_2$

ar fi grupări glucofore, iar

1) grupările H
2) „ $-CH_3-CH_2$
3) „ $-CH_2OH$
4) „ $-CHOH-CHOH$ ar fi grupări auxogluce.

Hexozele conţin glucoforul 1 şi auxoglucul 4; glicerobul, glucoforul 2 şi auxoglucul 3.

Gustul sărat este provocat în general de compuşi anorganici: NaCl, KCl, $MgCl_2$, NH_4Cl, unii sulfaţi, bromuri, ioduri, nitraţi de potasiu şi sodiu, formiat de sodiu. Gustul sărat ar fi datorit ionilor Cl^-, Br^-, I^-, SO_4^{--}, şi NO_3^-. Unii compuşi organici, ca dietilamina, monometilamina sub formă de clorhidraţi, au gust sărat.

Gustul acru e datorit în special ionului H^+.

Gustul astringent este dat de acizi în diluţii foarte mari.

Gustul amar e provocat în special de compuşii organici — mai ales alcaloizi, unele glucozide — acid picric, cum şi de unele săruri minerale, ca sărurile de magneziu, amoniu, sodiu şi calciu. O modificare chimică — chiar mică — poate transforma senzaţia de amar în senzaţie de dulce; zaharina, intens dulce, are o serie de derivaţi cu gust amar; dulcina, de 500 de ori mai dulce decât zahărul, capătă gust amar prin înlocuirea atomului de oxigen cu un atom de S, iar compuşii care conţin gruparea NO_2 au un gust amar.

Concentraţiile minime care pot trezi senzaţiile gustative sunt *a*) pentru senzaţia de dulce: 1/200; pentru zahăr, 1/100—1/200, pentru dulcină, 1/400; *b*) pentru senzaţia de sărat, 1/400 pentru NaCl; *c*) pentru senzaţia de acru 1/15 000 pentru HCl şi *d*) 1/2 000 000 pentru chinină, pentru senzaţia de amar.

Corelaţia dintre structura chimică a excitanţilor şi excitaţia olfactivă

Pentru aceeaşi serie de compuşi homologi cu rol excitator, puterea stimulatorie creşte progresiv dela cel mai simplu compus al seriei până la cel mai complex. Mirosul alcoolilor monoatomici creşte în intensitate începând cu alcoolul metilic până la alcoolul amilic, în raport de 1/10 000. Compuşii analogi din punct de vedere chimic, ca de exemplu combinaţiile sulfului, seleniului, telurului, care aparţin aceleiaşi grupe, cu hidrogen, radical metil sau etil, au miros neplăcut. Elementele din grupa a 7-a a sistemului Mendeleev, Cl, Br, I au miros iritant. Compuşi organici ca acetatul de etil, de propil, de butil, au un miros acetic.

TRANSUDATE, EXUDATE. LICHIDUL SINOVIAL

Transudatele rezultă din trecerea anormală a plasmei interstiţiale în cavităţile sau spaţiile lacunare (lichidul de edem este un transudat).

Exudatul este provocat de un proces inflamator şi este caracterizat printr'un conţinut mare în proteine, ceeace permite diferenţierea lui de transudat. Compoziţia transudatelor şi exudatelor variază cu organul şi cavităţile unde sunt acumulate. Conţin mici cantităţi de lipide, steroli, combinaţi cu proteinele sub formă de cenapse sau libere.

Scanned with OKEN Scanner

Lichidul sinovial

Compoziţia lichidului sinovial la om este redată în tabelul 50.

Tabelul 50

N neproteic.	22	—33	mg % cc
N ureic. . .	13	—18	„ „ „
N aminic . .	4,7	— 7	„ „ „
Proteine totale	1,39	— 6,02	„ „ „
Albumine. . .	1,03	— 3,72	„ „ „
Globuline. . .	0,025	— 2,16	„ „ „
Mucine. . . .	0,41	— 0,61	„ „ „
NaCl	573	— 604	„ „ „

Compoziţia lichidului variază cu starea de oboseală a articulaţiilor.

Conţine acid *hialuronic*, care are proprietatea de a fixa apa, formând un gel. Este substratul specific al hialuronidazei, enzimă capabilă să reducă vîscozitatea lichidului sinovial prin depolimerizarea acidului hialuronic care îi conferă o vîscozitate mare. Pe baza acestei proprietăţi, hialuronidaza se utilizează fie ca factor de difuziune — asociat cu diferite medicamente injectabile — fie ca atare, având, în acest caz, rolul de a lichefia gelul prezent în articulaţii (în reumatism, artrite). Cantitatea de lichid sinovial poate creşte în anumite cazuri foarte mult, provocând hidrartroze acute sau cronice.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL VII

BIOCHIMIA SECREȚIILOR

LAPTELE

Laptele este produsul de secreție al glandelor mamare. Acestea ar funcționa ca o membrană semipermeabilă pentru unele din componentele plasmatice (apă, săruri) și selectiv față de alte componente, ceeace indică o participare activă a țesutului glandular. Laptele constitue un aliment complect pentru animalele tinere în creștere (fig. 150).

Proprietățile și compoziția laptelui variază cu o serie întreagă de factori, dar sunt foarte asemănătoare, în linii mari, în toată seria animală. Compoziția cantitativă variază dela o specie animală la alta și chiar în cadrul aceleiași specii se găsesc variații foarte mari. Cantitatea și calitatea laptelui sunt influențate mult de alimentație.

Dăm componentele chimice ale laptelui uman comparativ cu acelea ale laptelui de vacă, deoarece acesta constitue unul din alimentele de bază (vezi tabelul 51).

Tabelul 51

Compoziția laptelui uman și de vacă
Valori medii exprimate în procente

Constituentul	Lapte uman	Lapte de vacă	Constituentul	Lapte uman	Lapte de vacă
Apă	87,5	87,3	Cloruri	0,12	0,18
Substanțe solide.	12,5	13,0	Citrați	0,125	0,325
Proteine totale .	1,0—1,5	3,0—4,0	P_2O_5	0,039	0,205
Cazeină.	1,1	3,0	NaOH	0,017	0,085
Lactalbumină . .	0,4	0,5	KOH.	0,078	0,175
Lactoglobulină .	0,3	0,03	CaO	0,033	0,160
Grăsimi.	3,0—4,0	3,5—5,0	Fe	0,0005	0,000088
Lactoză.	7,0—7,5	4,5—4,9	Cu	0,00008	0,00005
Gino- și alolactoză	0,8	—	Zn	0,00075	0,0003
Cenușă	0,2	0,7			

Din acest tabel se vede că procentul de proteine (cazeină) și de cenușă este mai mic în laptele uman, iar conținutul în glucide mai mare decât în cel de vacă.

Scanned with OKEN Scanner

Laptele de vacă conține mai mult P decât laptele uman, datorită conținutului mai mare al acestuia în cazeină, fosfoproteina din lapte. Laptele uman, datorită conținutului mai mic în substanțe minerale, are o putere tampon față de acizi mai mică decât laptele de vacă.

Doi șobolani de aceeași vârstă. *Stg.* — Șobolan hrănit fără lapte (pâine și mere) *Dpt.* — Șobolan hrănit cu pâine și lapte.

Fig. 150. Valoarea alimentară a laptelui.

Pentru folosirea laptelui de vacă în alimentația artificială a copilului se recomandă diluarea, pentru a reduce conținutul în săruri și în proteine, și adăugarea de zahăr, pentru a mări concentrația acestuia până la aceea a laptelui uman.

Compoziția laptelui variază mult în raport cu perioada care urmează nașterii copilului; în special colostrul diferă mult în compoziția lui față de laptele secretat ulterior. Colostrul este secretat în primele 12 zile dela naștere și este caracterizat printr'un conținut mult mai mare în proteine (lactalbumină și lactoglobulină) 2,27% față de 1,56% după 1—9 luni (ceeace îl face coagulabil prin căldură) și un conținut mai mic în grăsimi (2,83% față de 3,26%, după 1—9 luni). Colostrul uman are densitatea 1,040—1,060 (pe când laptele are densitatea 1,0296) și conține un ozid nereducător, ginolactoza. Are un conținut bogat în substanțe minerale, vitamine C și A și carotenoide.

In special componenta globulinică este mult crescută și ar fi identică cu euglobulina din serul sanguin. Ea ar procura sângelui copilului nou născut această proteină.

Proteinele din lapte

Cazeina, lactalbumina și *lactoglobulina*

Cazeina reprezintă, în laptele de vacă, aproximativ 80—90% din proteinele totale, lactalbumina 10—20%. In laptele uman, lactalbumina reprezintă 30—40% din proteinele totale, deci repartiția proteinelor este diferită în laptele uman și în cel de vacă. Se pare că proteinele laptelui matern sunt reținute în totalitate de copil, pe când proteinele laptelui de vacă sunt eliminate. Proteinele din lapte nu sunt identice cu acelea din sânge; astfel, pare probabil, că deși ar deriva din proteinele sanguine, suferă anumite transformări specifice în glanda mamară. Se crede că ar deriva din componenta proteică a glicoproteinei din sânge, deoarece aceasta dispare din sângele arterial care ajunge la glanda mamară. Componenta glucidică din această glucoproteidă este formată din galactoză, manoză și glucozamină și ar putea fi folosită pentru sinteza lactozei din lapte.

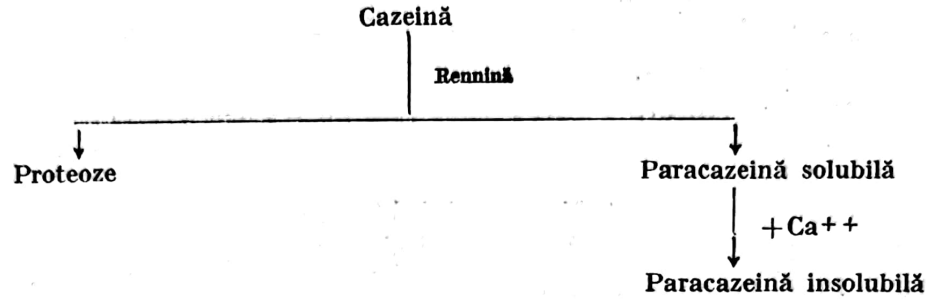
Cazeina este proteina cantitativ cea mai importantă din laptele de vacă. In laptele uman, proporția de cazeină și celelalte proteine este aproximativ aceeași. Cazeina este o fosfoproteină care conține 0,7% P și care derivă din fosfații minerali din sânge.

Cazeina conține sulf puțin, 0,75%, are un conținut slab în cistină. Are punctul izoelectric = 4,7. Se găsește în laptele de vacă probabil sub formă

de sare de calciu, iar în laptele uman sub formă de cazeinat de potasiu. Nu precipită prin încălzire la fierbere.

Sub acțiunea enzimei proteolitice, renina, cazeina este scindată hidrolitic în paracazeină și o componentă de natura proteozelor, ambele solubile.

Paracazeina solubilă este transformată în prezența ionilor de calciu în paracazeinat de calciu insolubil, care se depune sub formă de chiag. Această acțiune constitue așa numitul „proces de coagulare" al laptelui.



Precipitanții calciului (oxalații și citrații) împiedică formarea chiagului.

Cazeina din laptele uman se deosebește de aceea din laptele de vacă prin faptul că este coagulată mai greu sub acțiunea acizilor și a renninei. Stomacul nou născutului secretă labfermentul sau presura (chimozina), care coagulează laptele. Labfermentul este diferit de pepsină, căci sucul gastric al nou născutului este aproape lipsit de activitate proteolitică, iar pepsina cristalizată are o foarte redusă activitate coagulantă. Paracazeina este digerată de pepsină, și anume, cu atât mai lesne cu cât flocoanele sunt mai mici.

Lactalbumina se găsește în proporție de 0,5% în laptele de vacă, 0,4% în laptele uman. Lactalbumina din lapte este constituită din mai multe fracțiuni.

Lactoglobulina este deasemenea un amestec de proteine; una din componente, β-lactoglobulina, a fost izolată în formă pură și analizată în ceeace privește componența în aminoacizi; are o greutate moleculară de 40 000—42 000. Laptele de vacă și laptele uman se deosebesc în anumită măsură în ceeace privește repartiția diverselor fracțiuni proteinice și componența lor în aminoacizi. Dăm un tabel al aminoacizilor din laptele uman în comparație cu laptele de vacă (vezul tabelul 52).

Laptele de vacă este mult mai sărac în cisteină decât laptele uman; acesta din urmă este ceva mai sărac în tirozină, metionină și izoleucină.

Tabelul 52

Procentul de aminoacizi din proteinele laptelui uman și laptelui de vacă

Procente exprimate la 100 g proteină

	Lapte uman	Lapte de vacă		Lapte uman	Lapte de vacă
Arginină	4,3	3,8	Cistină	2,1	0,7
Lizină	6,8	6,6	Metionină	2,4	3,7
Histidină	2,9	2,6	Treonină	4,5	4,5
Tirozină	5,4	6,4	Leucină	10,1	10,6
Triptofan	1,7	1,4	Izoleucină	7,5	8,5
Fenilalanină	5,6	5,7	Valină	9,5	8,4

Grăsimile din laptele uman

Sunt formate în special din grăsimi neutre; în cantităţi mici există fosfatide, colesterol liber şi sub formă de esteri. Grăsimile din laptele uman conţin acid oleic în cantitate de 30—37% din grăsimile totale, acid palmitic 22—24%, acizi graşi nesaturaţi cu două duble legături 7%, acizi graşi cu C_{20-22} 3-4%, acid stearic 8-9%, acid miristic 8—14%, acid lauric 5—7%, acid decanoic 2—3%.

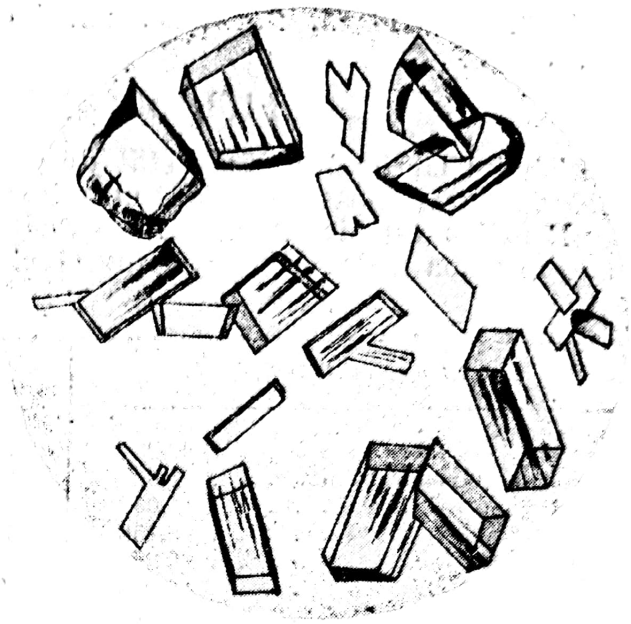


Fig. 151. Cristale de lactoză

Grăsimile din laptele de vacă constitue untul; conţine (la 100 grăsimi totale) 31,9% acid oleic, 12,2% acid palmitic, 19,8% acid miristic, 14,9% acid stearic, 0,1% acid linolenic, 0,2% acid linoleic, 5,8% acid lauric, 2,9% acid butiric, 1,9% acid caproic, 1,6% acid capric, 0,8 acid caprilic, deci o serie întreagă de acizi graşi cu catenă scurtă C_4—C_4. Aproximativ 36% din grăsimi sunt acizi graşi nesaturaţi de tipul acidul oleic.

Compoziţia margarinei se aseamănă mai mult cu aceea a grăsimilor din laptele uman.

Grăsimile din lapte nu sunt, probabil, provenite din grăsimile din sânge printr'un simplu transfer. Nu se ştie cu precizie care este origina acizilor graşi cu catenă scurtă din lipidele din lapte. La rumegătoare, grăsimile s'ar forma în rumen sub acţiunea bacteriilor şi de aci ar fi absorbite în circulaţia sanguină.

Lactoza (β-galactozido-4-glucoza)

Lactoza este zahărul din lapte. Se admite în general că derivă din glucoza sanguină. Sângele arterial, prin trecerea sa prin glanda mamară, pierde 25% din conţinutul în glucoză. Scăderea zahărului sanguin sub acţiunea insulinei duce la o scădere a lactozei din lapte. Ţesutul mamar, pus în contact cu glucoza, o transformă în parte în lactoză, ceeace arată capacitatea acestui ţesut de a realiza transformarea sterică în galactoză. Laptele conţine 0,2% glicogen, cantităţi mari de pentoze şi un izomer al lactozei, alolactoza (β-galactozido-6-glucoza).

Pigmenţii

Pigmenţii din lapte constau în special din carotenoide, iar carotenul este cel mai răspândit pigment. Se găsesc xantofile în cantităţi mici.

Laptele conţine o serie întreagă de vitamine, şi anume: vitaminele A, C, complexul vitaminei B, mari cantităţi de vitamină D.

Astfel, laptele uman conţine vitamina A (1—5,6 mg la litru), 1 mg vitamină B_2, 0,06—0,6 mg vitamină B_1 şi 30—50 mg acid ascorbic la litru.

Laptele conţine o serie de enzime: proteaze, lipaze, amilază, galactază,

Scanned with OKEN Scanner

catalază, peroxidază, fosfataze, xantinoxidaze aldehidoxidaze (enzime Schardinger).

LICHIDUL LACRIMAL

Lichidul lacrimal este secretat de glandele lacrimale. Este o secreție incoloră, clară, apoasă, care are următoarea compoziție (vezi tabelul 53).

pH-ul lichidului lacrimal normal este ușor alcalin, cuprins între 7,6—8,0; scade în urma inflamațiilor conjunctivei și corneei. Cantitatea de lacrimi

Tabelul 53

Valori exprimate la %		Valori exprimate la %	
Apă	98,2	Glucide	0,650
Substanțe solide totale	1,8	Cloruri (ClNa)	0,600
Cenușă	1,05	Sodiu (Na_2O)	0,60
Azot total	0,158	Potasiu (K_2O)	0,14
Azot neproteic	0,051	Amoniac	0,001
Uree	0,030	Fosfați (alcalini și alcalino-pământoși)	0,02
Proteine totale	0,669		

secretată în condiții normale este mică; diferite substanțe (substanțele lacrimogene) sau excitațiile psihice măresc volumul acestei secreții.

Excitația nervului simpatic provoacă lacrimi cu un pH alcalin și cu aspect turbure, pe când excitația trigemenului, lacrimi limpezi.

In lacrimi se găsește enzima bacteriolitică, lizozimul, în cantitatea cea mai mare (după albușul de ou), în comparație cu alte țesuturi și umori animale. Lizozimul are acțiune litică în special asupra bacteriilor saprofite și Gram-pozitive, ceeace-i conferă un rol protector pentru ochi.

Cercetări în diferite afecțiuni ale ochiului au arătat că unele boli de ochi sunt însoțite de valori scăzute ale cantității de lizozim din lacrimi (de exemplu în keratite, trahom, conjunctivite cronice și acute, etc.).

Ermolieva și Bujanovscaia stabilesc o corelație între avitaminoza A (provocând cheratomalacia șoarecelui) și scăderea titrului lizozimic.

SPERMA

Sperma este un lichid opalescent de consistență vîscoasă grație granulațiilor și globulelor mucoide răspândite, pe lângă leucocite și spermatozoizi, în plasma seminală.

Are o compoziție neomogenă. Compoziția chimică determinată pe un amestec de plasme seminale are următoarele caracteristici (vezi tabelul 54)

Tabelul 54

Densitate	1,030	Na Cl	0,20 g %
Apă	90,32 %	CO_2	50 cc %
pH	7,2—7,3	P anorganic	0,40—0,50 mg % cc
Reziduu fix	9,68	P acidosolubil	95 „ „ „
Albumine coagulate prin căldură	1,39 g %	P (în spermină)	15—30 „ „ „
Albumine solubile la cald	0,41 „ „	Ca	24—25 „ „ „
Nucleoproteide	0,20 „ „	Glucoză	200—300 „ „ „
Extract eterosolubil	0,17 „ „	Uree	72 „ „ „
Substanțe minerale solubile	0,68 „ „	Acid lactic	90—100 „ „
„ „ nesolubile	0,22 „ „	Colesterol	80 „ „ „

O componentă caracteristică spermei este *spermina*, care conţine în moleculă putresceină şi propilamină.

$$\underbrace{H_2N-CH_2-CH_2-CH_2}_{\text{propilamină}}-\underbrace{NH-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2}_{\text{putresceină}}-$$

$$\underbrace{-NH-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2}_{\text{propilamină}}$$

Spermina se elimină sub formă de difosfat $C_{10}H_2N_4$, $2PO_3H_3$. $6H_2O$ şi a fost obţinută pe cale sintetică. Prin evaporarea spermei, difosfatul de spermină cristalizează, formând cristale caracteristice, numite cristalele lui Charcot, care le-a identificat şi în sângele leucemicilor şi în sputa astmaticilor.

Altă bază azotată prezentă în spermă este *spermidina*:

$$\underbrace{H_2N-CH_2-CH_2-CH_2}-\underbrace{NH-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2}$$

O componentă constantă a spermei este *colina*, care se identifică (în medicina legală) prin formarea de cristale brune, rombice, de periodură de colină (cristalele Florence), prin tratarea cu reactivul iodo-iodurat.

In spermă se găsesc o amilază care scindează glicogenul, o trombokinază şi hormoni. S'a pus în evidenţă deasemenea hialuronidaza, enzimă capabilă să depolimerizeze gelul vîscos care înconjoară ovulul, facilitând astfel fecundarea acestuia de către spermatozoizi.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL VIII

BIOCHIMIA EXCREȚIILOR

MECANISMELE DETOXIFICĂRII IN ORGANISM

Detoxificarea este mecanismul prin care organismul se apără împotriva substanțelor toxice rezultate din diversele catabolisme — fie prin distrugerea acestor componente toxice, fie prin transformarea lor în componente mai puțin toxice. Detoxificarea se face prin reacții catalizate enzimatic prin intervenția enzimelor respective din diversele organe. Mecanismul de detoxificare variază în general cu specia animală.

Pentru o serie de componente toxice, de exemplu pentru histamină, detoxificarea începe chiar în intestin, unde se găsește o histaminază, enzimă care degradează o parte a acestei componente.

Peretele intestinal, ca atare, oprește o serie de substanțe toxice, dar nu pe toate, unele din ele trecând în ficat, unde sunt detoxificate. Rinichiul conține deasemenea o serie de enzime cu acțiune detoxificantă.

Reacțiile care au loc în detoxificare sunt în special reacții de *oxidare* și *conjugare*, mai puțin de *reducere*, *hidroliză* și *metilare*.

Un mecanism de detoxificare este deasemenea acela de transformare a unui acid puternic într'un acid mai slab, care poate fi eliminat ca atare; de exemplu, acidul benzoic (care are constanta de disociere $6{,}5 \times 10^{-5}$), în acid hipuric (care are constanta de disociere $2{,}3 \times 10^{-4}$).

Oxidarea este mecanismul de detoxificare prin care substanța toxică este degradată până la CO_2 și H_2O (de exemplu, alcool etilic). Se poate însă ca, intermediar, să se formeze compuși și mai toxici, acidul formic și formaldehida, de exemplu în cazul alcoolului metilic. Prin oxidare se poate însă să rezulte compuși care să fie mult mai ușor degradați în organism; de exemplu, prin desaminarea oxidativă a unor compuși aromatici, pot rezulta cetoacizi mult mai ușor oxidabili, ca în cazul fenilalaninei, care este desaminată oxidativ la acid fenilpiruvic. Prezența radicalului $CH_3-CO-COOH$ face ca nucleul aromatic să fie complect oxidat:

$$C_6H_5-CH_2-CH(NH_2)-COOH + O \rightarrow C_6H_5-CH_2-CO.COOH + NH_3$$

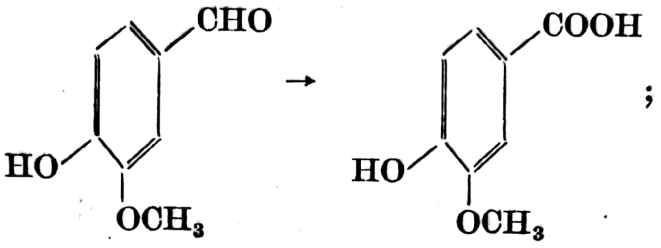
Oxidarea acizilor grași fenilsubstituiți — ca de exemplu acidul fenilvaleric și fenilbutiric — conduce la acizi ușor degradabili până la CO_2 și H_2O.:

$$\underset{\text{acid fenilvaleric}}{C_6H_5-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-COOH} \rightarrow \underset{\text{acid fenilpropionic}}{C_6H_5CH_2-CH_2-COOH} \rightarrow$$

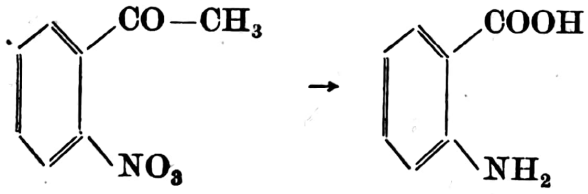
$$\rightarrow \underset{\text{acid benzoic}}{C_6H_5-COOH}$$

$$\underset{\text{acid fenilbutiric}}{C_6H_5-CH_2-CH_2-CH_2-COOH} \rightarrow \underset{\text{acid fenilacetic}}{C_6H_5.\ CH-COOH} + \underset{\text{acid acetic}}{CH_3-COOH}$$

Introducerea unei grupări carboxil în nucleul benzenic este un mecanism de detoxificare important: introducerea unei asemenea grupări în nucleul fenolic, toxic, produce acid salicilic, netoxic; în molecula toluolului, acid benzoic. Transformarea unui alcool primar, a unei aldehide sau cetone în acid, constitue deasemenea un mecanism de detoxificare:



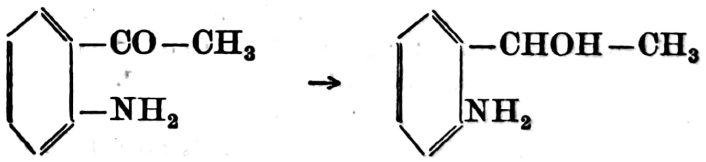
aldehida vanilică — acid vanilic



O-nitroacetofenonă — acid antranilic

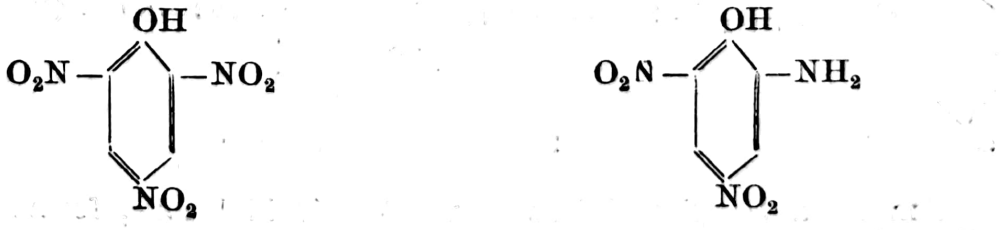
Reducerea nu este o cale frecventă de detoxificare, deoarece compușii reduși sunt de obicei mai toxici decât cei oxidați. Totuși, se folosește această cale în cazul aldehidelor care sunt transformate în alcooli, eliminați ulterior prin conjugare. De exemplu, cloralhidratul este redus în tricloretanol, care se poate combina cu acidul glicuronic; o-aminoacetofenona se transformă în o-aminofeniletilcarbinol:

$$\underset{\text{cloral}}{Cl_3-C-CHO} \rightarrow \rightarrow \underset{\text{tricloretanol}}{Cl_3-C-CH_2-OH};$$



O-aminoacetofenonă — O-aminofeniletilcarbinol

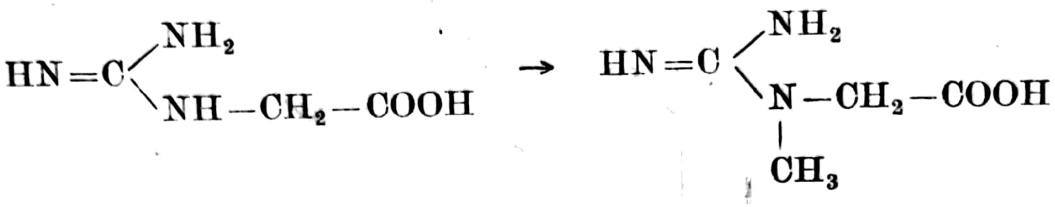
Acidul picric este transformat în acid picromic:



acid picric — acid picromic

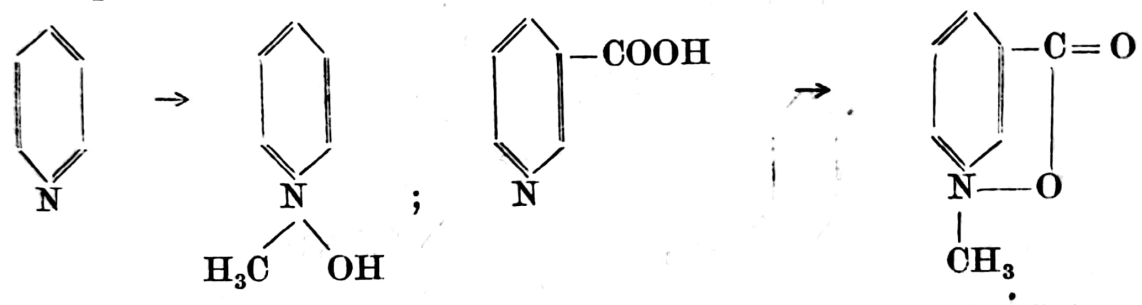
Hidroliza poate interveni în detoxificarea unor compuși; de exemplu, acidul acetilsalicilic este hidrolizat la acid acetic și acid salicilic; primul este oxidat, iar al doilea este excretat. O serie de glicozide sunt detoxificate prin hidroliză în compusul glucidic și aglicon.

Metilarea constitue deasemenea un mecanism de detoxificare a unora din compușii toxici. De exemplu, acidul guanidinacetic este eliminat în urină sub formă de creatină:



acid guanidinacetic — creatină

Această reacție de metilare se aplică în special compușilor conținând nucleul piridinic:

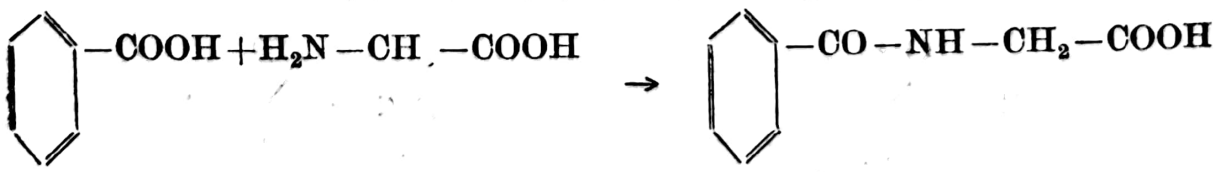


piridină — metilhidroxipiridină — acid nicotinic — trigonelină

Acidul nicotinic, deși este un factor vitaminic necesar, este totuși eliminat în urină sub formă de trigonelină, printr'un mecanism de metilare urmat de unul de betainizare.

Detoxificarea prin conjugare este mecanismul cel mai frecvent folosit în organism. Conjugarea are loc între componenta toxică care nu poate fi distrusă pe altă cale, de exemplu, pe cale oxidativă, și o componentă care rezultă în mód normal. Prin cuplare se realizează compuși mai solubili și mai puțin toxici care se pot elimina. Cuplarea poate avea loc cu o serie de acizi: glicocolul, ornitina, glutamina, taurina, cisteina, acidul glicuronic, acidul sulfuric, acetic. Metilarea este un caz particular al detoxificării prin conjugare.

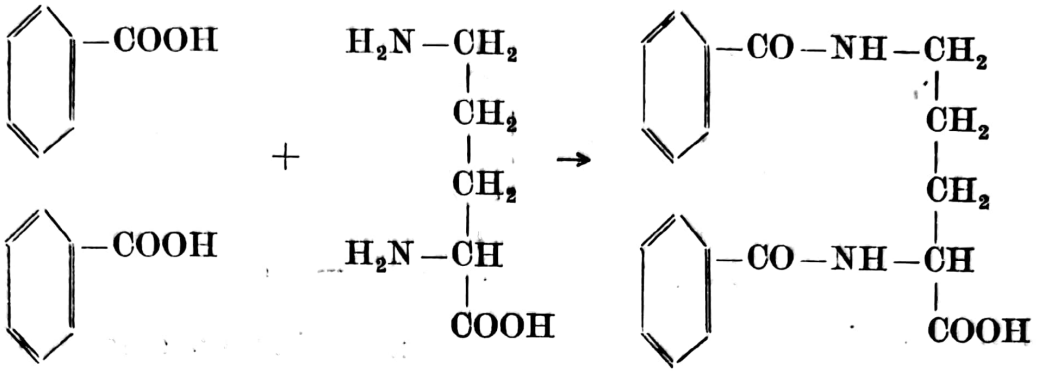
Glicocolul. Acidul benzoic, la om, se poate cupla cu glicocolul, formând acidul hipuric. Conjugarea are loc în ficat și rinichi la cobai, iepure, șobolan, în rinichi, la câine.



acid benzoic — glicocol — acid hipuric

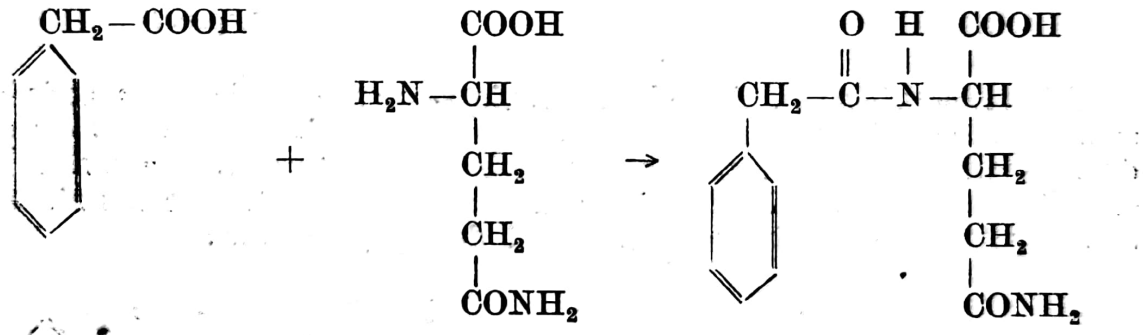
Am văzut că glicocolul se combină cu acidul colic, formând acidul glicocolic.

Ornitina înlocuește glicocolul în detoxificarea acidului benzoic la păsări; prin cuplarea acestora rezultă acidul orniturie:



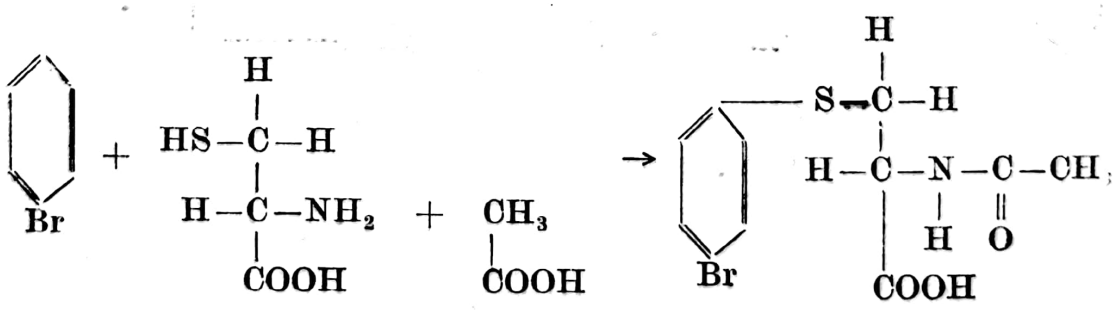
acid benzoic ornitină acid orniturie

Glutamina este folosită la om și cimpanzeu pentru detoxificarea acidului fenilacetic:



acid fenilacetic glutamină fenilacetilglutamina

Cisteina este folosită pentru detoxificarea hidrocarburilor, de exemplu: brombenzenul, naftalenul, antracenul, formând acizii mercapturici:

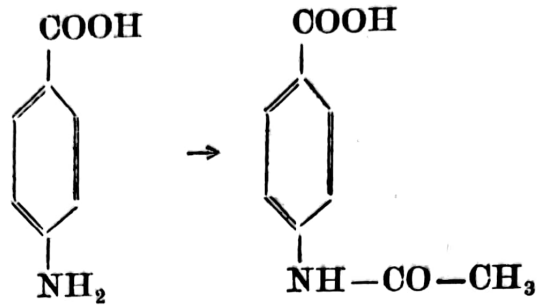


brombenzen cisteină acid acetic acid bromfenilmercapturic

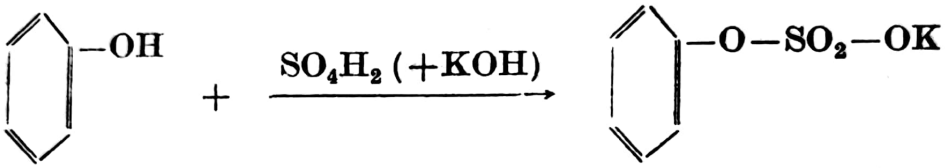
Taurina se cuplează cu acizii biliari, constituind compușii de eliminare acizii taurocolici.

Acidul acetic intervine, am văzut, în formarea acizilor mercapturici prin combinarea cu gruparea aminică a cisteinei. La om și

iepure, acizii paraaminobenzoici sunt acetilați; deasemenea, derivații sulfamidelor:

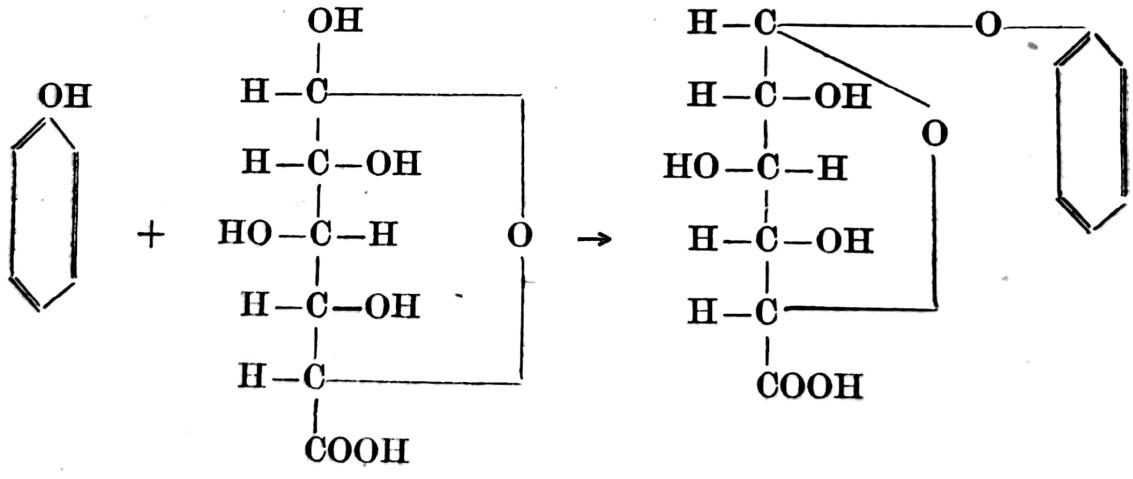


Sulfoconjugarea este deasemenea un mecanism de detoxificare, în care intervine acidul sulfuric:



fenol — fenilsulfat de potasiu

Glicuronoconjugarea. Acidul glicuronic se poate cupla cu o serie de componente: acizi aromatici, fenoli, alcooli alifatici, alcaloizi, cu o serie de hormoni sexuali (cu care se elimină în urină). Cuplarea se face între oxidrilul semiacetalic al acidului glicuronic și oxidrilul fenolic sau alcoolic al compusului respectiv, legătura fiind de tip glicozidic:



acid glicuronic — acid fenolglicuronic

ELIMINAREA URINARĂ

Secreția urinii la nivelul rinichiului are rolul să elimine din organism substanțele inutile sau dăunătoare și excesul de apă.

Secreția urinară este dirijată de metabolismul apei, acesta la rândul lui fiind dirijat de o serie de factori, dintre care unii au fost analizați la capitolul asupra metabolismului acestei componente.

Funcţia renală este legată de un enorm consum de energie, ceeace constitue o indicaţie că formarea urinii în acest organ nu este un simplu proces de filtrare, difuziune sau osmoză, ci necesită intervenţia mai activă a însuşi ţesutului renal.

Formarea urinii, după teoriile adoptate, ar fi un proces combinat, care se petrece în doi timpi, şi anume :

1. *un proces de ultrafiltrare*, pur fizic, care se petrece în glomerul şi are drept rezultat un ultrafiltrat plasmatic, lipsit de proteine şi componente coloidale, care nu trec prin glomerul, dar având în rest aceeaşi componenţă ca şi ultrafiltratul plasmei sanguine şi

2. un proces de *concentrare*, de modificare a raporturilor componentelor din acest ultrafiltrat, care duce la realizarea urinii propriu zise. Acest proces are loc în tubii renali, printr'o reabsorbţie selectivă a acestui ultrafiltrat. Este un proces selectiv, consumator de energie, în care ţesutul renal intervine în mod activ. Glomerulul lucrează ca un filtru. Reabsorbţia în tubii renali este realizată de mecanisme chimice complexe, catalizate de sisteme enzimatice. Intr'adevăr, inhibitorii activităţii enzimatice, ca de exemplu CNH, duc la inhibarea secreţiei urinare, fără să inhibe însă formarea ultrafiltratului.

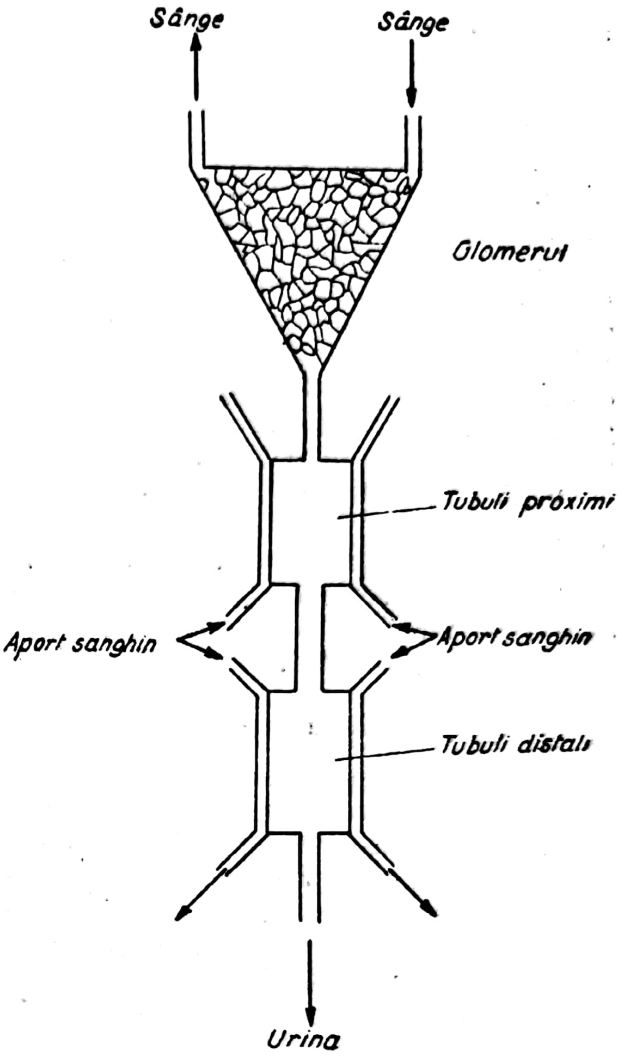


Fig. 152. Schema mecanismului celular al acidificării urinii, conform teoriei schimbului de ioni.

Trei factori intervin astfel în elaborarea urinii : filtrarea glomerulară, secreţia tubulară şi reabsorbţia tubulară. Echilibrul dintre aceşti factori determină acest proces.

Interpretarea mecanismului funcţiei renale ca o funcţie de filtrare—reabsorbţie este acum general admisă.

Secreţia urinii este sub dependenţă neuro-hormonală.

FUNCŢIILE RENALE

Rolul fundamental al rinichiului este de a menţine în limite constante compoziţia normală a plasmei sanguine.

Rinichiul are astfel rolul să elimine o serie întreagă de componente din plasmă, unde acestea apar în mod fiziologic sau patologic. Dintre

acestea, o parte se regăsesc în urină într'o concentrație mult mai mare (uree, acid uric, creatinină).

O altă serie de substanțe reabsorbabile nu se elimină deloc, ca de exemplu glucoza, sau se elimină în cantități mici, ca de exemplu NaCl. Eliminarea substanțelor variază în raport cu utilitatea lor pentru organism. Constituenții ultrafiltratelor glomerulare se pot grupa în trei clase, în raport cu comportarea lor față de procesul de reabsorbție.

1. Substanțe activ reabsorbite: glucoza, Na, Cl, Ca, Mg, K, P, S, care au un așa numit „prag de eliminare" înalt, adică valoarea minimă din sânge a acestei substanțe, dedesubtul căreia nu se face eliminarea prin urină, este destul de mare. Pentru glucoză, această valoare este cuprinsă între 1—3 g $^0/_{00}$; pentru NaCl = 5,6—5,8 g $^0/_{00}$. Reabsorbția glucozei necesită o fosforilare prealabilă sub acțiunea fosforilazei, iar defosforilarea se face sub acțiunea unei fosfataze.

2. A doua serie de substanțe este aceea a substanțelor care trec prin tubi printr'un simplu proces de difuziune; acestea au un „prag de eliminare" mic (ureea, acidul uric, etc.). Sunt *substanțe pasiv reabsorbite.*

3. A treia serie e reprezentată de *substanțele fără prag de eliminare*, care nu suferă nici resorbția, nici difuziunea prin tubi; sunt deci absente în lichidul reabsorbit.

Formarea amoniacului urinar

Formarea amoniacului urinar are loc în rinichi. Acest fapt a fost dedus din următoarele date experimentale:

1. sângele din vena renală conține de două-trei ori mai mult amoniac decât cel din artera renală;

2. nivelul amoniacului sanguin nu este influențat de cel al amoniacului urinar. Cauzele care modifică amoniacul urinar (acidoza diabetică) nu modifică amoniacul sanguin;

3. nefrectomia nu modifică valorile amoniacului sanguin.

Origina amoniacului urinar. Amoniacul urinar nu provine din uree, așa cum se credea la un moment dat, ci provine în mică măsură din aminoacizi (în rinichi există desaminaze ale *d*- și *l*-aminoacizilor) și în special din glutamină, sub acțiunea glutaminazei, care se găsește în rinichi. Aproximativ 60% din amoniacul urinar provine din glutamină.

Formarea acidului hipuric

Rinichiul are, ca și ficatul, rol în detoxificarea acidului benzoic prin cuplarea lui cu glicocolul, ceeace duce la formare de acid hipuric:

$$\underset{\text{acid benzoic}}{C_6H_5-COOH} + \underset{\text{glicocol}}{H_2N-CH_2-COOH} \rightarrow \underset{\text{acid hipuric}}{C_6H_5CONH\ CH_2\ COOH} + H_2O$$

Această funcție de conjugare a fost socotită strict renală. Cercetări ulterioare au arătat că acidul hipuric este format în special în ficat, dar este excretat în urină, ceeace a dus la utilizarea exreției de acid hipuric ca test al funcției hepatice. Cel mai folosit dintre testele utilizate este procedeul lui Quick.

Se administrează 1,77 g benzoat de sodiu și se determină după o oră acidul hipuric din urină. Urina persoanelor normale, elimină, în aceste condiții, 1 g acid hipuric.

Scanned with OKEN Scanner

Rolul rinichiului este extrem de important în reglarea *izotoniei* și *izoioniei* lichidelor din organism. Am văzut la capitolul reglării izotoniei care este intervenția rinichiului. Vom expune în cele ce urmează rolul rinichiului în reglarea izoioniei, și anume, a ionilor de hidrogen.

Reglarea echilibrului acido-bazic

Rinichiul intervine în reglarea echilibrului acido-bazic prin trei mecanisme:

1. transformarea fosfaților bibazici în fosfați monobazici;
2. eliminarea acizilor sub formă liberă și
3. formarea amoniacului.

Prin toate aceste mecanisme, rinichiul păstrează organismului rezerva de alcali necesară atunci când modificări fiziologice sau patologice creează condiții care tind la acidificarea mediului intern al organismului.

Vom analiza fiecare mecanism în parte.

1. **Transformarea fosfaților bibazici în fosfați monobazici.** Rinichiul primește sângele la un pH slab alcalin (în medie 7,40) și elimină o urină la un pH acid, în medie pH=6. Acest proces este realizat printr'o modificare a raportului dintre fosfații monobazici și cei bibazici:

Raportul $\frac{PO_4H_2Na}{PO_4HNa_2}$ este egal cu $\frac{1}{5}$ în sânge și cu $\frac{9}{1}$ în urină. Rinichiul realizează astfel o inversiune a raportului și, grație acestui lucru, păstrează în organism alcalii ca atare (Na, K, Mg, Ca) și în special Na; prin acest mecanism de trecere dela acid bibazic la acid monobazic, 40% din rezerva de alcali fixați la acidul fosforic din plasmă sunt reținute de organism, și anume, pentru fiecare moleculă de acid fosforic — un ion Na^+.

Transformarea se face probabil la trecerea urinii prin tubii renali prin două mecanisme; *a*) printr'o reabsorbție selectivă a fosfatului bibazic, eliminându-se numai fosfatul monobazic și *b*) printr'o reacție a fosfatului monobazic cu acidul carbonic, cu formare de bicarbonat, care este reținut selectiv; în acest mod se menține în organism componenta alcalină:

$$PO_4HNa_2 + CO_3H_2 \rightleftarrows \underset{\text{excretat}}{PO_4H_2Na} + \underset{\text{absorbit}}{CO_3HNa}$$

Acestea sunt cele două mecanisme posibile: reabsorbția selectivă a fosfatului bibazic și formarea bicarbonatului (fig. 153).

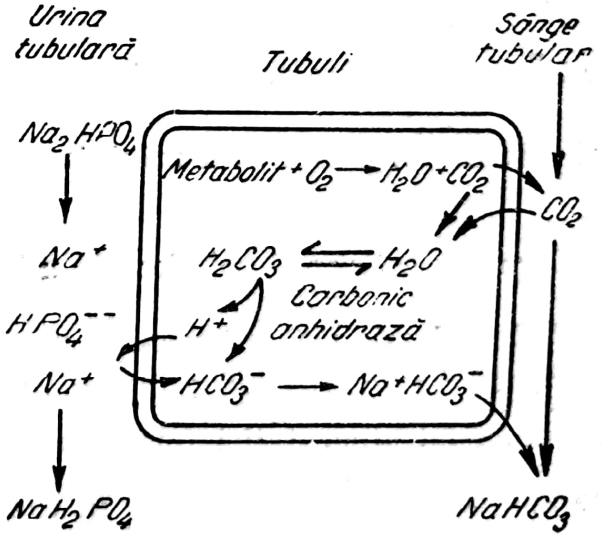


Fig. 153. Schema funcțională a rinichiului

2. **Eliminarea acizilor ca atare prin urină** constitue al

doilea mecanism prin care intervine rinichiul în reglarea echilibrului acido-bazic.

Rinichiul are capacitatea de a reține din acizii organici (acizi slabi) componenta alcalină și de a elimina componenta acidă ca atare. Acest mecanism este foarte important în cazuri patologice, de exemplu în diabet: acizii acetilacetic și β-hidroxibutiric se găsesc în sânge sub formă de săruri alcaline (Na, K); în urină pot fi însă eliminați sub formă liberă, și anume, acidul acetilacetic 5—11%, acidul β-hidroxibutiric 20—55%. Prin acest proces se conservă organismului componenta alcalină care urmează a fi folosită la o nouă invazie cu acizi a organismului. O urină acidă poate elimina 12% din acidul lactic, 91% din acidul uric sub formă liberă, 8% din acidul hipuric (restul fiind eliminat sub formă de săruri alcaline sau de amoniu).

Eliminarea sub formă de acizi liberi este condiționată însă de valoarea constantei de disociere a acidului corespunzător. Acizii clorhidric, sulfuric, acizii tari în general nu pot fi eliminați sub formă de acizi liberi. Aceștia sunt eliminați sub formă de săruri sau sunt, sub această formă, reabsorbiți; de exemplu, HCl sub formă de NaCl sau printr'un schimb ionic cu acidul carbonic, conform unui echilibru de tip Donnan, prin membrana tubulară. In acest mecanism, ionul H^+ din plasmă, provenind din acidul carbonic, va fi schimbat cu ionul Na^+ prin membrana tubulară și acest din urmă ion alcalin va fi reținut ca atare sub formă de bicarbonat. Acest schimb ionic este verosimil având în vedere conținutul destul de important în carbonicanhidrază și faptul că sulfamidele, care inhibă acțiunea acestei enzime, au și un efect depresor asupra excreției renale.

3. **Formarea amoniacului în rinichi** este al treilea mecanism prin care se menține, prin intervenția acestui organ, rezerva de alcali în organism.

Amoniacul format în rinichi poate înlocui bazele alcaline din acizii din organism și îi poate elimina sub formă de săruri de amoniu, păstrând organismului aceste baze alcaline.

Toate aceste mecanisme fac ca rinichiul să elimine o urină acidă (deși sângele pe care îl primește are o reacție slab alcalină, pH=7,4). pH-ul urinilor puternic alcaline este condiționat în special de raportul $\frac{CO_3H_2}{CO_3HNa}$, iar în cazurile normale, în special de raportul $\frac{PO_4H_2Na}{PO_4HNa_2}$, acesta având o valoare de $\frac{50}{1}$ în cazul unei urini foarte acide.

Caracterele fizice și chimice ale urinii

Volumul urinii. Cantitatea de urină excretată în 24 de ore la adult e în medie de 1 000—1 500 cc pentru bărbați și 1 000—1 200 cc pentru femei. Condiții fiziologice și patologice modifică mult aceste valori. Astfel, vârsta, felul alimentației (mai mult sau mai puțin bogată în lichide), temperatura (volumul scade când temperatura crește, căci eliminarea de apă se face și pe alte căi). In cazuri patologice se disting: *poliuria* (în diabet, în alcoolism în nefrite azotemice), *oliguria*, care se întâlnește în nefrite acute, boli hepatice, stări febrile, în gută, etc. și *anuria*, pro-

vocată de cauze mecanice (traumatisme, calculi), intoxicații (cu mercur, fenol) sau leziuni ale căilor renale.

Culoarea urinii, în general galbenă, este datorită unor pigmenți, *urocromul*, *urobilina*, *uroporfirina* și *indoxilul urinar*.

Vîscozitatea urinii e ceva mai mare decât a apei și e condiționată în special de cantitatea de uree.

Tensiunea superficială este mai mică decât a apei (64—69 dine/mm). Variază în anumite afecțiuni; prezența sărurilor biliare tensioactive scade valoarea ei.

Presiunea osmotică este determinată de prezența sărurilor minerale, în special de ClNa.

Δ crioscopic variază între —2, 24—0, 59°, valoarea medie = —1,35°.

Greutatea specifică, în condiții normale, variază între 1,015—1,025; variază invers cu volumul, relație care nu există în cazuri patologice, în special în diabet, unde se elimină mari cantități de urină cu o densitate mare (1 040) sau în nefritele cronice, unde se elimină cantități mici de urină cu densitate mică (1 010).

Rinichiul lezat nu mai are capacitatea de a realiza variațiile normale de densitate și volum urinar.

pH-ul urinii este slab acid, cuprins între valorile de 5—7. Cu cât regimul alimentar este mai bogat în carne, cu atât pH-ul urinii este mai acid. Hrana vegetală, prin sărurile alcaline minerale și organice, modifică pH-ul urinii spre neutralitate sau chiar spre alcalinitate.

Compoziția urinii

Reziduul uscat atinge valori între 40—50 g °/₀₀, ureea constituind jumătate din acest reziduu (vezi tabelul 55).

Tabelul 55

Constituenții anorganici ai urinii

Valori în g la 1000 cc urină	
Cloruri, exprimate în NaCl	9,0
Fosfor, exprimat în P_2O_5	2,0
Sulf total, exprimat în SO_3	1,5
Sodiu, exprimat în Na_2O	4,0
Potasiu, exprimat în K_2O	2,0
Calciu, exprimat în CaO	0,2
Magneziu, exprimat în MgO	0,2
Fier	0,003

Clorurile din urină provin în special din clorurile alimentare. Au un prag de eliminare înalt.

Fosforul se găsește în urină în special sub formă de fosfat monosodic (PO_4H_2Na) și disodic (PO_4HNa_2), și în cantitate mai mică sub formă de $(PO_4H_2)_2$ Ca, $(PO_4H_2)_2$ Mg, $PO_4H_2NH_4$.

Sulful apare în urină sub trei forme:

1. sub formă de *sulfat anorganic*,
2. sub formă de *esteri sulfurici*,
3. sub formă de *sulf neutru*.

Sulfații minerali rezultă din degradarea proteinelor, respectiv a aminoacizilor conținând sulf (cistină, metionină). O parte din acești sulfați minerali sunt conjugați în ficat cu fenoli sau cu substanțe produse de putrefacțiile bacteriene ale proteinelor (indol, derivat din tirozină, fenoli, scatol, derivați din triptofan), formând esteri sulfurici. Această sulfoconjugare constitue un mecanism de detoxificare a organismului, proces care este realizat în ficat; în alterări ale ficatului, substanțele acestea toxice (fenoli, etc.) sunt eliminate prin rinichi în cantități foarte mari.

Scanned with OKEN Scanner

Constituenții organici ai urinii

Constituenții organici ai urinii sunt compuși azotați și neazotați (vezi tabelul 56).

Tabelul 56

Compușii azotați sunt :

Valori exprimate în g la 1000 cc urină	
Uree	25—35 g
Amoniac	0,6 „
Acid uric	0,5—1,0 „
Creatinină	0,5—2,5 „
Acizi aminați (glicocol)	0,5—1,3 „

Alte substanțe organice : acizi grași, alcooli, glucide, se găsesc în cantități mici.

Ureea $O=C<^{NH_2}_{NH_2}$ este componenta organică care se găsește în cea mai mare cantitate în urină (fig. 154).

Este produsul ultim de degradare a proteinelor.

Variații cantitative ale catabolismului azotului proteic se răsfrâng în cantitatea de uree excretată în urină. Locul de formare a ureei este ficatul și am văzut la capitolul respectiv prin ce mecanism. Excreția ureei se face prin rinichi.

Viteza de excreție, după Ambard, este legată de raportul concentrației ureei în sânge și urină. Cercetări ulterioare (Van Slyke) au arătat că acest fapt e adevărat numai când volumul de urină trece peste o anumită limită minimă, 2 cc pe minut.

Determinarea valorilor ureei în sânge și urină, precum și a raportului acestor valori, în corelație cu volumul urinii eliminate, constitue un test al funcției renale (coeficientul de epurație al lui Van Slyke).

Variațiile fiziologice ale ureei urinare sunt sub dependența regimului alimentar, vârstei, etc.

Variațiile patologice pot fi în sensul unei creșteri a eliminării (hiperazoturie) sau în sensul unei scăderi a acestei eliminări (hipoazoturie).

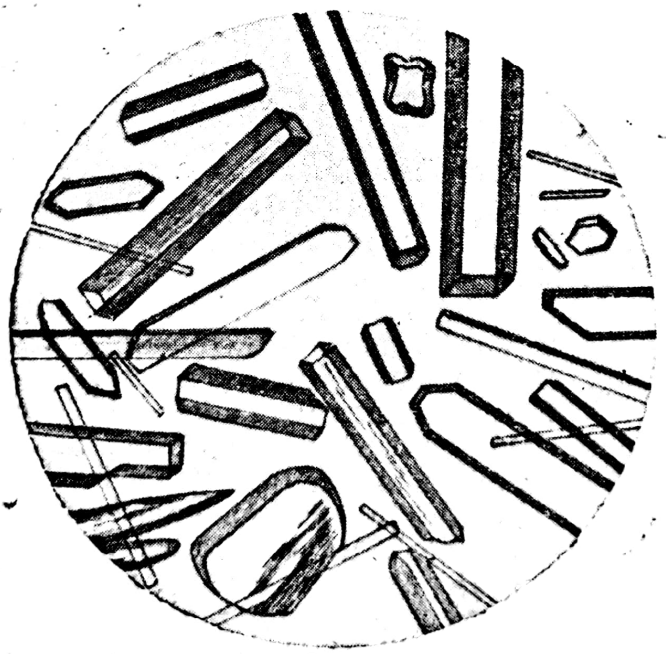


Fig. 154. Cristale de uree

Hiperazoturii se produc în boli febrile, diabet, diabet azoturic, ictere (infecțios, catarral), în afecțiuni nervoase, în intoxicații (Hg, As, P, Sb).

Hipoazoturii au loc în alterări ale celulelor hepatice, (cancer al ficatului, ciroză atrofică), în alterări ale epiteliilor tubulare.

Acidul uric este a doua componentă cantitativ importantă după uree. Există în special sub formă de săruri alcaline. Este foarte puțin solubil, iar prezența fosfaților îi mărește solubilitatea. Cam jumătate din acidul uric for-

mat pe cale endogenă şi exogenă apare în urină. Excreţia acidului uric este influenţată de alimentaţie; deasemenea această excreţie are variaţii diurne.

Guta este o afecţiune caracterizată prin depunerea uraţilor sub formă solidă în ţesuturi. Depozitarea se face în special în cartilaje. Boala este asociată frecvent cu modificări fiziologice ale rinichilor.

Creatinina ($C_4H_7N_3O$), anhidrida internă a creatinei (acid metilguanidinacetic)

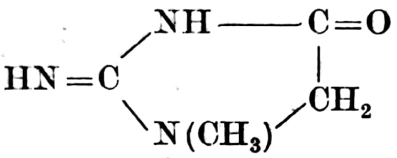
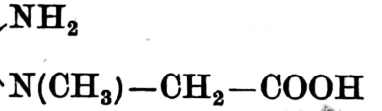


Fig. 155. Cristale de creatinină

se găseşte în urina adultului (fig. 155). Origina principală a creatininei urinare este creatina musculară.

S'a constatat că valoarea creatininei urinare este mai mare decât a aceleia din ser, ceeace a dus la interpretarea că acest produs este filtrat prin glomeruli şi concentrat în tubi.

Eliminarea zilnică de creatinină urinară este de 1,2—2,0 g la bărbat şi 0,8—1,5 g la femeie.

Creatina ($C_4H_9N_3O_2$)  nu se găseşte normal în urina bărbatului adult; este frecvent prezentă în urina femeii adulte şi totdeauna în urina copiilor de ambele sexe, până la pubertate (fig. 156).

Creşteri ale creatinei urinare, creatinurii patologice, au loc în afecţiuni musculare (atrofia muşchilor), în inaniţie, pierderi masive de proteine, diabet, febră. Arginina şi glicolul au un rol important în sinteza creatinei, deasemenea glicociamina şi metionina.

Aproape toţi acizii aminaţi se găsesc în urină. In mod constant se găsesc glicocolul, tirozina, leucina. In general, *d*-aminoacizii sunt mai repede eliminaţi decât aminoacizii seriei naturale.

Compuşii organici neazotaţi prezenţi în urină sunt: acizi graşi volatili (acid formic, acetic, butiric); diacizi, ca acidul oxalic, a cărui origină în urină nu se cunoaşte cu siguranţă, dar se crede că ar proveni din oxidarea zaharurilor. Metabolismul defectuos al acidului oxalic duce la depozitarea acestuia sub formă de calculi. Anumite alimente măresc concentraţia acidului oxalic (respectiv a oxalatului de calciu insolubil) în urină (de exemplu, ceaiul, cafeaua, spanacul, etc.), iar sărurile de magneziu, fosfatul disodic, favorizează solubilizarea lui. Ca un produs normal al fermentaţiei

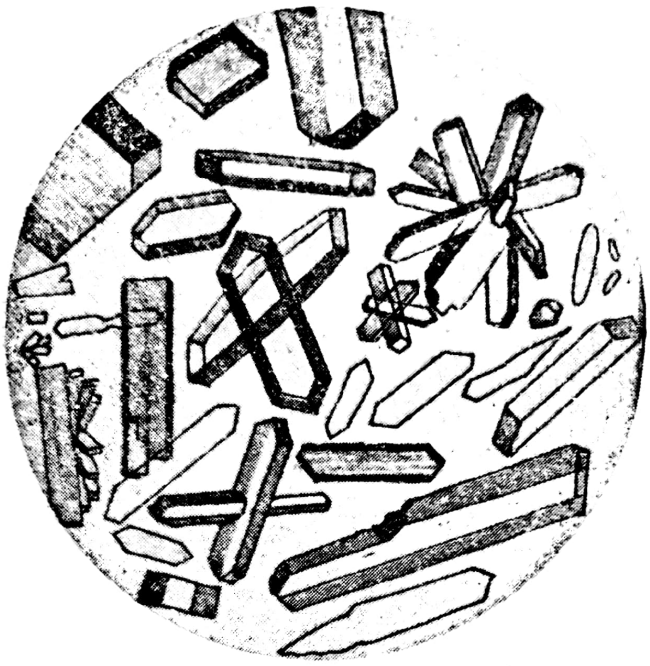


Fig. 156. Cristale de creatină

glucozei se găsește în urină acid citric, deasemenea acid lactic-ambii în cantități mici.

Se mai găsește în urină un *zahăr reductor*; deasemenea s'au identificat *hormoni* și *vitamine* sub formă de derivați și *enzime*.

CONTROLUL FUNCȚIEI RENALE

Deoarece funcția primordială a rinichiului este aceea de concentrare și de eliminare, o insuficiență renală se traduce printr'o reducere a capacității rinichiului de a realiza aceste funcții:

1. excreția substanțelor azotate neproteice (uree, acid uric, creatină);
2. excreția de apă și
3. capacitatea de reabsorbție.

Cercetarea comparativă a componentelor din plasmă și urină indică, pentru unele din ele, (uree, acid uric, creatină), o concentrație mai mare în urină decât în sânge. Acest fapt e general pentru toate substanțele de eliminare, care sunt dăunătoare sau inutile.

O altă serie de substanțe există în sânge, dar nu se elimină în urină decât în cantități extrem de mici, și numai atunci când valoarea lor în sânge depășește o anumită limită sunt eliminate în cantități mai mari; rinichiul are deci, în raport cu acești compuși chimici, un prag de eliminare.

Anumite substanțe, de exemplu glucoza, sunt prezente în filtratul glomerular, dar nu apar în urina finală decât atunci când cantitatea de sânge depășește o anumită valoare. Ele sunt reabsorbite la nivelul tubilor.

Alte substanțe, ca de exemplu roșul de fenol, apar în urină în concentrații mai mari decât cele corespunzătoare filtrației glomerulare și sunt excretate de celulele mari ale epiteliului tubular. Este necesar, așa dar, să se facă controlul celor două procese: glomerular și de reabsorbție sau excreție activă prin tubi. Pentru acest control este necesar să se determine viteza de filtrare glomerulară și cantitatea de apă reabsorbită din filtratul glomerular de către tubi. S'a folosit inulina, polizaharid fiziologic inert, cu o greutate moleculară de aproximativ 5 000, ca indicator al filtrației glomerulare și al reabsorbției tubulare. Inulina este total filtrabilă din plasmă prin glomerul și molecula ei este suficient de mare pentru a nu trece din nou în sânge prin tubi, astfel că este eliminată cantitativ prin urină. Dacă la controlul unor substanțe anumite se găsește o viteză de filtrare prin glomerul egală cu a inulinei, înseamnă că acestea trec, ca și inulina, prin tubi fără să fie reabsorbite — adică raportul

$$\frac{\text{substanța x}}{\text{inulină}} = 1.$$

Dacă raportul $\frac{\text{substanța x}}{\text{inulină}}$ este mai mic decât unitatea, înseamnă că substanța x este reabsorbită de tubi din filtratul glomerular. Dacă raportul este mai mare decât unitatea, atunci această substanță x este activ excretată de tubi și, în același timp, filtrată prin glomerul. Cu această metodă s'a făcut controlul unei serii întregi de componente cu acțiune biologică, de exemplu sulfamide, penicilină, etc.

Testele pentru controlul funcției renale

Sunt teste care constau în determinarea unor componente în sânge și urină și teste de epurație renală.

In sânge se determină azotul neproteic, ureea, acidul uric, creatinina, creatina — deoarece o insuficiență renală duce la o reducere a capacității de excreție a acestor componente neproteice.

In urină se determină excreția acelorași componente azotate neproteice, excreția apei (volumul și densitatea urinii), respectiv puterea de concentrare a rinichiului.

Testul de concentrare a ureei constă în administrarea a 15 g uree în 100 cc apă după golirea vezicii urinare; se recoltează apoi urina după 1 oră și 2 ore, se determină ureea în proba a doua. O concentrare de 2% sau mai mult indică o funcție normală.

Testul cu fenolsulfonftaleină. Se injectează intravenos fenolsulfonftaleină. La normali, 65% din cantitate sunt excretate în urină în primele 2 ore; în insuficiențele renale, cu pierderea puterii de concentrare a rinichilor, eliminarea este sub 50% și într'un timp mai lung.

Testul de diluare și concentrare (Volhard și Strauss) constă în determinarea volumului și greutății specifice ale urinii timp de 4 ore la intervale de câte o oră, după ingestia a 1 500 cc apă.

Testele care implică controlul în sânge și urină sunt cele mai exacte.

Raporturile de concentrare se calculează din valoarea raportului concentrației substanțelor diverse, ca de exemplu ureea, creatinina, clorurile din sânge și urină. Astfel, pentru uree, raportul normal este de 66,6 = $= \frac{\text{2000 mg \% urină}}{\text{30 mg \% sânge}}$; pentru creatinină, raportul are valoarea 75, pentru acid uric 10 — 20, pentru cloruri 1 — 2. Raportul dintre concentrația ureei în urină și sânge, determinat de Ambard și cunoscut sub numele de *constanta Ambard*, ia în considerare ureea din sânge în grame (U), viteza de excreție a urinii în grame pentru un interval de 24 ore = D, ureea în urină în grame la litru = C, raportul dintre 70 kg — greutatea corporală standard — și greutatea corporală g a individului examinat.

Formula este următoarea: $K = \frac{U}{\sqrt{D \times \frac{70}{g} \times \frac{\sqrt{C}}{\sqrt{25}}}}$,

25 fiind excreția normală de uree urinară zilnică, în grame.

Variațiile constantei ureosecretorii a lui Ambard reflectă variațiile valorii funcționale a rinichiului, și anume:

k = 0,07 indică o valoare funcțională normală
k = 0,08 indică un deficit de 21%
k = 0,09 „ „ „ „ 40%
k = 1,00 „ „ „ „ 50%.

Testul de epurație al ureei (Van Slyke) măsoară deasemenea funcția renală (arată eficiența cu care rinichiul excretă ureea), luând în considerare cantitatea de sânge, care ar ceda întreaga cantitate de uree pe care o conține dacă s'ar presupune că această cantitate trece singură prin rinichi în fiecare minut. De exemplu, dacă 1 000 cc sânge trec pe minut și concentrația ureei în sânge este de 40 mg%, iar eliminarea în urină este de 30 mg pe minut, înseamnă că este eliminată cantitatea de uree corespunzătoare la 75 cc. Epurația maximă este dată de relația $Cm = \frac{UV}{B}$, unde U = uree în mg la 100 cc urină, V = volumul în cc corespunzător unui interval dat, B = mg uree la 100 cc sânge. Valorile normale ale coeficientului sunt peste 70.

Testul de epurație a inulinei este folosit pentru determinarea vitezei de filtrare a rinichiului. Inulina, fiind un polizaharid cu moleculă relativ mică (greutate moleculară = 5 100), trece prin membrana glomerulară, nu este metabolizată, nu este excretată sau reabsorbită în tub, nu se combină cu proteinele plasmatice. Epurația ei, egală cu 530 cc pe minut, măsoară viteza de filtrare. *Manitolul* este deasemenea folosit pentru determinarea vitezei de filtrare sau pentru determinarea vitezei de reabsorbție a excreției tubulare, a unei componente urinare date, de exemplu creatinina.

Constituenții patologici ai urinii

Glucoza poate exista în urină în urme foarte slabe și sub limitele de sensibilitate ale metodelor curente de laborator; glicozuria, adică apariția glucozei în urină, poate fi fiziologică sau patologică. Glicozuria alimentară și cea emoțională, care sunt asociate cu hiperglicemii, sunt glicozurii fiziologice.

Glicozuria diabetică este o glicozurie patologică corelată cu hiperglicemie. Valorile glicozuriei, în această afecțiune, pot atinge limite foarte mari (5—10%).

Deși în diabet există poliurie, greutatea specifică a urinii este crescută datorită prezenței glucozei.

Testele pentru identificarea glucozei în urină sunt bazate pe proprietatea reductoare a glucozei față de soluțiile metalelor alcaline, pe proprietatea acesteia de a roti planul luminii polarizate, sau aceea de a forma ozazone cu fenilhidrazină.

Pentozele apar în urină în unele cazuri de pentozurie alimentară și pentozurie cronică. Se identifică cu reactivi respectivi (Bial) sau prin tehnica cromatografică de partiție pe hârtie de filtru.

In urina femeilor însărcinate apare *lactoza*, care se diferențiază prin ozazona caracteristică sau prin testul pentru acidul mucic.

Proteinele. Ca și pentru glucoză, urmele de proteine din urina normală nu pot fi puse în evidență. In cazuri patologice apar în cantități variabile diverse tipuri de proteine, și anume: albumină și globulină; nucleoproteine, fibrină, oxihemoglobină, mioglobină, proteine Bence-Jones, proteoze, peptone.

Proteinuria este în genere datorită albuminelor plasmatice. Aceste componente, grație dimensiunii lor mici, difuzează mult mai ușor când

survine o alterare a permeabilității renale. Deseori sunt întovărășite de globuline din plasmă. Nu se știe dacă proteinele care apar în urină sunt proteinele plasmatice modificate sau ca atare.

Albuminuria renală este datorită unei modificări a presiunii sanguine sau unei deficiențe renale. In proteinuria benignă nu există o alterare renală permanentă; ea este determinată de cauze exterioare, băi reci, eforturi fizice. Albuminuria ortostatică este legată de poziția în picioare a pacientului și dispare când acesta este culcat. Proteinele străine injectate în curentul circulator sunt excretate prin urină. Albuminele care apar în urină în anumite cazuri patologice pot fi uneori diferite de proteinele tisulare sau sanguine, prin reacțiile pe care le dau.

Testele pentru proteinele urinare (albumină și globulină) sunt testele caracteristice proteinelor în general și se practică după filtrarea sau centrifugarea urinii (testul cu acid sulfosalicilic, cu acid azotic-azotos, testul prin fierbere și acidulare). Limitele între care variază albuminuria sunt foarte largi, și anume, dela urme abia perceptibile până la câteva zeci de grame.

Proteozele se găsesc în urină în anumite stări patologice (pneumonie, difterie, ulcer intestinal, carcinom atrofic renal).

Peptonele se găsesc rar, apariția lor fiind semnalată în infecția puerperală.

Proteina Bence-Jones (fig. 157), are o semnificație importantă de diagnostic în mielomul multiplu, în osteosarcomul mielogen. Este o proteină de tip special; a fost obținută în stare cristalizată și ar exista în mod normal, în cantități mici, în măduva oaselor. In condiții patologice poate fi excretată în cantități destul de mari (30—50 g zilnic).

Pentru identificarea proteinei Bence-Jones în urină și diferențierea ei de alte proteine se folosește proprietatea acesteia de a precipita la temperaturi mai mici (40—60°) și de a se disolva prin acidificare și încălzire la temperaturi mai ridicate (100°). Prin răcire, precipită din nou.

Sângele apare în urină în cazuri patologice: în hematurie apar globulele roșii intacte, în hemoglobinurie apare pigmentul sanguin singur. Hematuria e datorită unei leziuni renale sau a tractului urinar; hemoglobinuria este o urmare a hemolizei globulului roșu și poate apărea în scorbut, tifos, exantematic, în intoxicații cu unele substanțe.

Testele pentru punerea în evidență a sângelui în urină sunt bazate pe proprietatea pseudoperoxidazică a hemoglobinei (testul cu benzidină, foarte sensibil, cu reactivul Kastle-Mayer cu fenolftaleină, etc.).

Fig. 157. Proteina Bence-Jones cristalizată

Fig. 158. Cristale de acid hipuric

Elementele biliare. Acizii și pigmenții biliari apar în urină în anumite condiții patologice (icter) și sunt puși în evidență prin reactivii specifici. Testele pentru pigmenți biliari sunt bazate pe oxidarea pigmenților cu ajutorul diverșilor reactivi și formarea unor compuși colorați caracteristici. Se identifică bilirubina, urobilinogenul, urobilina.

Testul pentru acizi biliari (Hay) este bazat pe proprietatea tensioactivă a acestor componente.

Corpii cetonici care pot apărea în urină în anumite cazuri patologice sunt: acidul acetilacetic, acidul β-hidroxibutiric și acetona. Acești compuși rezultă din arderea incomplectă a acizilor grași, în condiții patologice (în cazul unui metabolism glucidic defectuos, în cazul unei alimentații lipsite de glucide sau în inaniție, în vărsături incoercibile, în febră, în anestezie cu eter, cloroform).

Cetonuria poate fi consecința unei cetonemii ridicate și este intensă în diabetul zaharat, în care caz se creează starea de acidoză-cetoză diabetică ce poate fi înlăturată prin administrare de insulină.

Melaninele. Pigmenții melanici nu apar în mod normal în urină, ci numai în anumite condiții patologice și în special în tumorile melanice. Urina proaspătă slab colorată devine brună sau neagră prin expunere la aer, datorită transformării melanogenului în melanină.

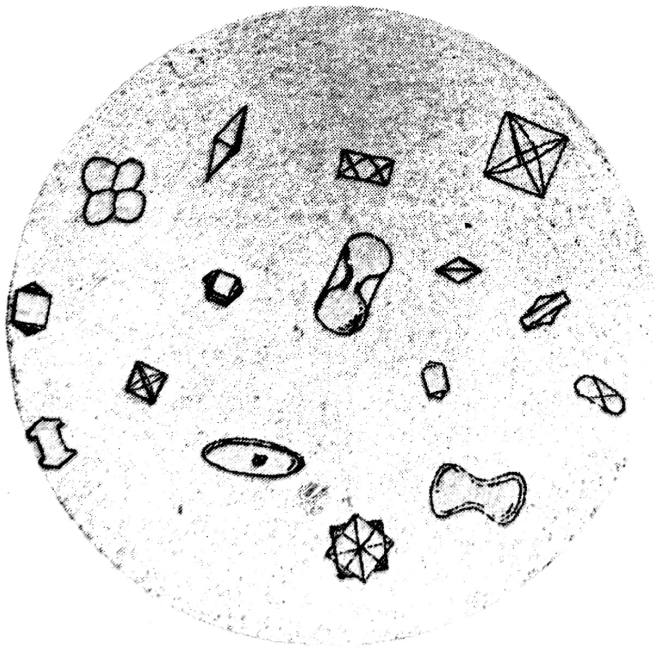


Fig. 159. Cristale de oxalat de calciu

Sedimentul urinar

Sedimentul urinar este constituit din toate componentele insolubile care se depun prin centrifugarea urinii la viteză mică și este format din elemente organizate și neorganizate.

Elementele organizate pot fi celule epiteliale a căror formă este caracteristică fiecărei regiuni a tractului urinar de unde provin; leucocite, globule roșii, cilindrii

urinari care provin din tubii uriniferi şi a căror prezenţă indică totdeauna o deficienţă renală. Sunt clasificaţi în cilindrii hialini, granulari, epiteliali, hematici, leucocitari, granulo-grăsoşi, ciroşi, după componenţa lor.

Elementele neorganizate din sedimentul urinar constau din săruri minerale şi substanţe organice: fosfat tricalcic, fosfat amoniaco-magnezian, acid uric, uraţi de sodiu şi de amoniu, carbonat de calciu, oxalat de calciu, sulfat de calciu, cistină, colesterol, acid hipuric, leucină, tirozină. După administrare de sulfonamide, acestea pot apărea în urină şi pot fi identificate graţie cristalelor lor caracteristice.

Fig. 160. Cristale de acid uric

Calculii urinari

Calculii urinari sunt de fapt aglomerări solide şi mai mari ale elementelor neorganizate ale sedimentului, aglomerări care se formează în tractul urinar. Dimensiunea şi forma lor variază cu localizarea. Calculii urinari pot fi simpli sau micşti, după cum sunt formaţi dintr'o singură componentă sau din mai multe. Formarea calculilor urinari pare să fie secundară unei infecţii a tractului urinar. Leucocite, bacterii, pot constitui nuclee de formare a calculilor urinari. Fermentaţia alcalină, adesea asociată cu unele infecţii, este favorabilă precipitării fosfaţilor de Ca şi Mg, componenţii cei mai frecvenţi ai calculilor. Calculii apar însă tot atât de frecvent în urinile aseptice.

Formarea unui concrement depinde de gradul de saturaţie a urinii cu constituentul cristalin respectiv; pH-ul are o importanţă destul de mare în acest proces. Astfel, acidul uric tinde să precipite în jurul pH = 5.

Fig. 161. Cristale de carbonat de calciu

Calculii micști de acid uric, urat de sodiu, oxalat și fosfat de calciu tind să se formeze la pH=6; calculii de fosfat de calciu la pH=7, calculii micști de fosfat de calciu, fosfat amoniaco-magnezian, urat de amoniu, la pH=7—8. Calculii care conțin carbonat de calciu, fosfat amoniaco-

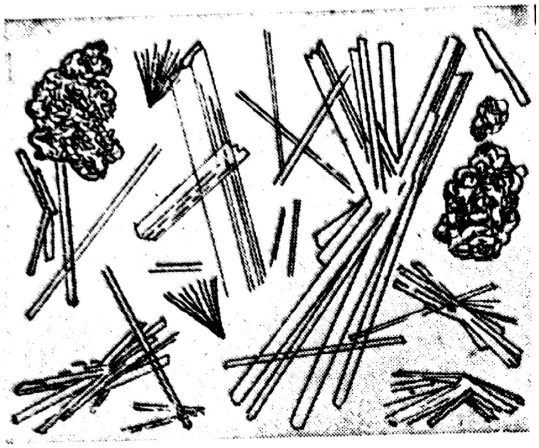


Fig. 162. Cristale de sulfat de calciu

magnezian, urat de amoniu se formează la un pH peste 8. Coloizii protectori pot înlătura precipitarea și deci formarea calculilor.

Există o netă corelație între excreția de citrat și formarea calculilor din săruri de calciu.

Excreția de citrat este redusă la pacienții la care se semnalează o creștere în depozitarea calciului; citratul ar reduce, astfel, tendința de precipitare a calciului.

Calculi renali formați din fosfat de calciu au fost produși experimental la șobolan prin administrarea de ergosterol iradiat sau de extract paratiroi-

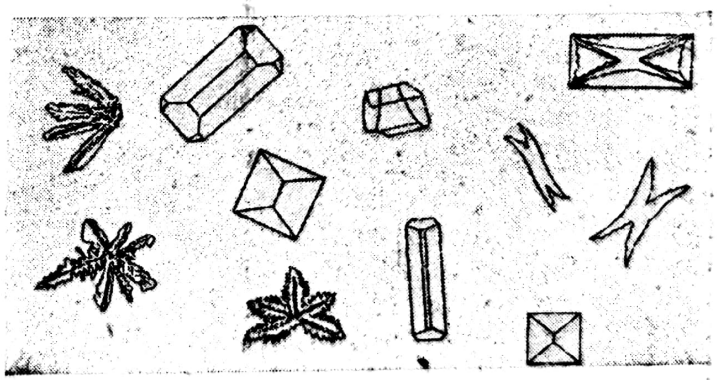


Fig. 163. Cristale de fosfat amoniaco-magnezian

dian în exces. Sunt datoriți probabil excreției în urină a unor cantități mari de calciu eliberat din oase.

Adesea calculii renali sau vezicali apar în afecțiunile osoase de natură distructivă.

Hiperparatiroidismul, hipervitaminoza D și, probabil, deficiența de vitamină A ar fi cauzele formării calculilor renali.

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 164. Cristale de urat acid de sodiu

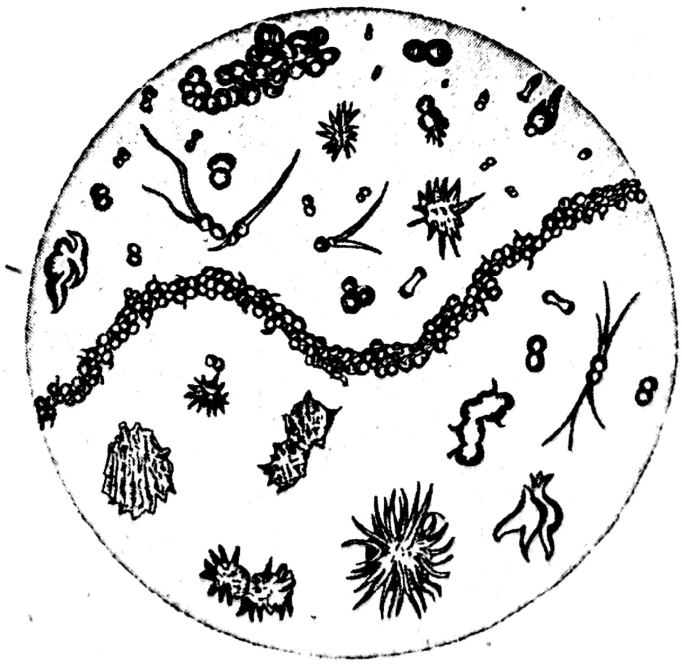


Fig. 165. Urat de amoniu

Scanned with OKEN Scanner

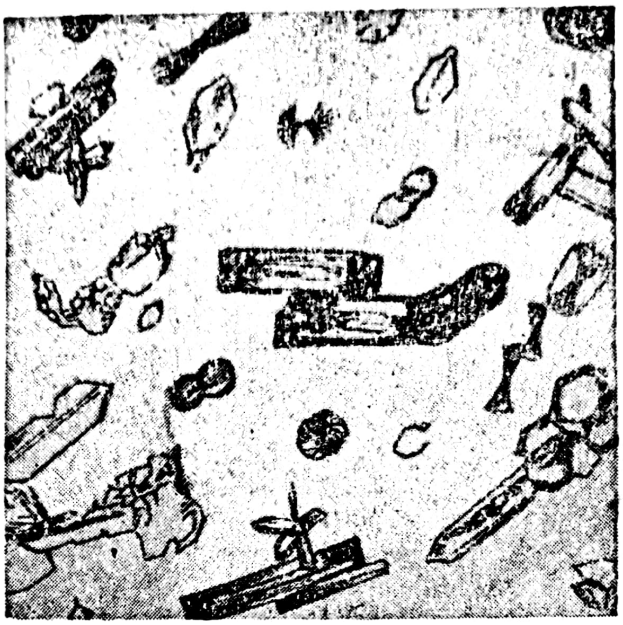


Fig. 166. Cristale de sulfatiazol (în urină)

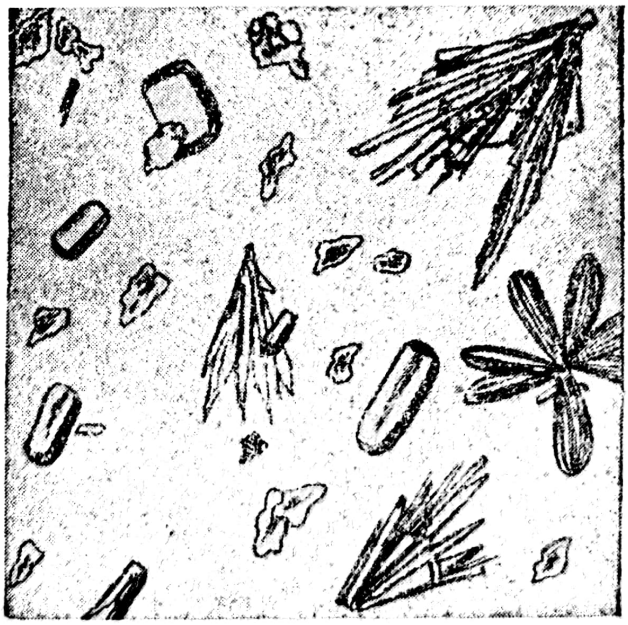


Fig. 167. Cristale de sulfapiridină (în urină)

Scanned with OKEN Scanner

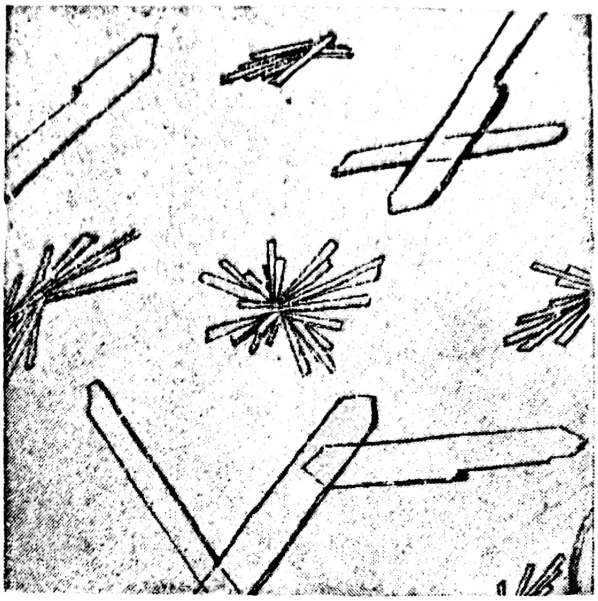


Fig. 168. Cristale de sulfanilamidă (în urină)

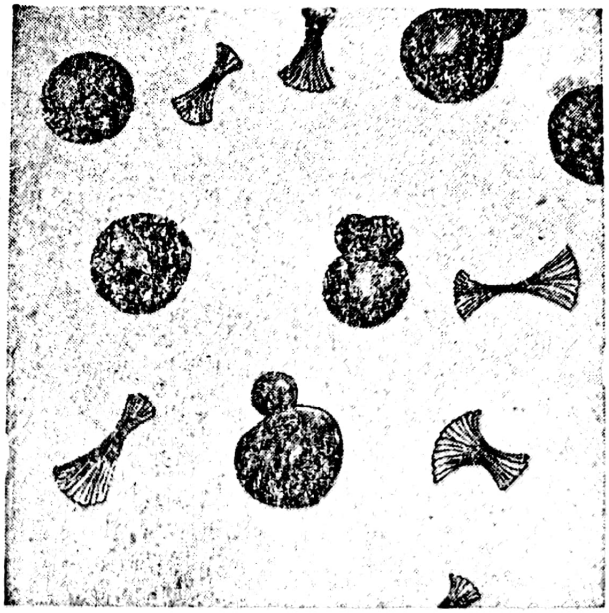


Fig. 169. Cristale de sulfadiazină (în urină)

Scanned with OKEN Scanner

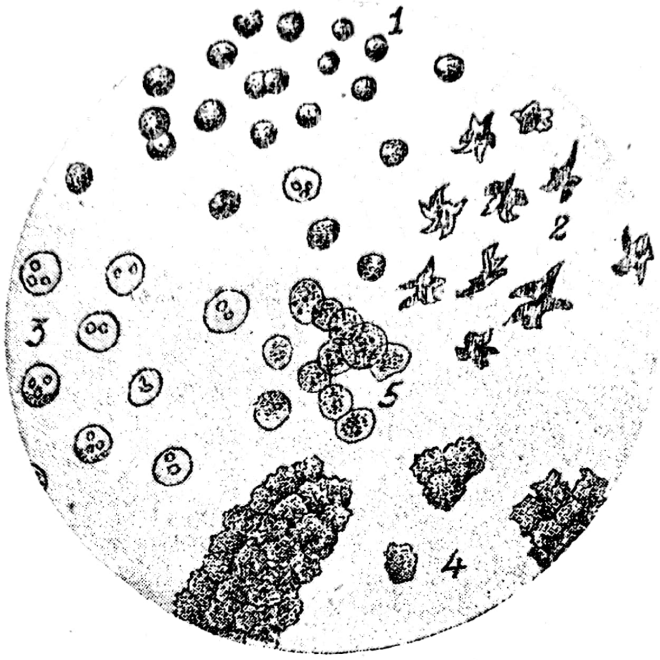


Fig. 170. Leucocite

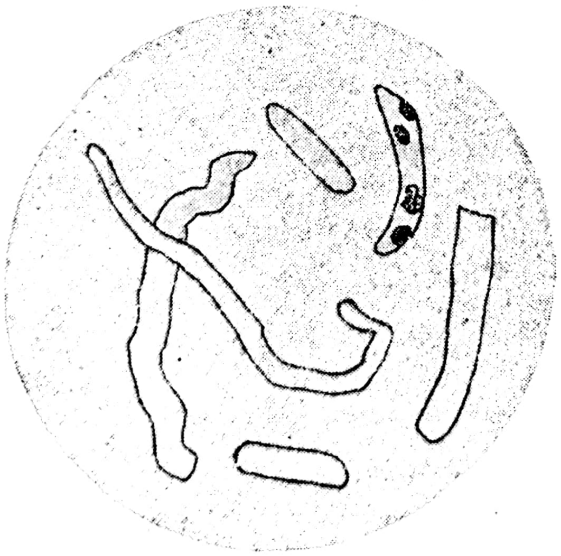


Fig. 171. Cilindri hialini (un cilindru este impregnat cu patru celule renale)

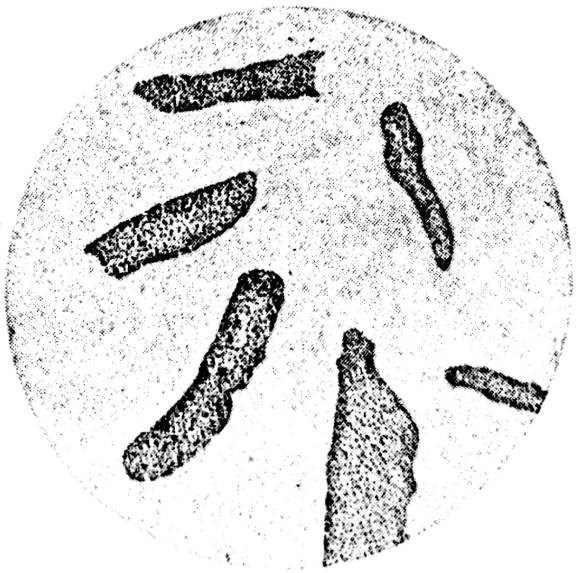
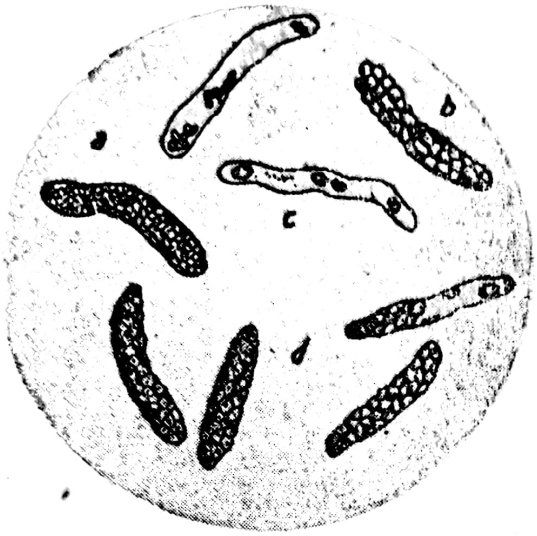


Fig. 172. Cilindri granuloși

Scanned with OKEN Scanner



a – cilindri hematici ; *b* – cilindri leucocitari; *c* – cilindri hialini impregnați cu celule renale; *d* – cilindri epiteliali.

Fig. 173. Cilindri celulari

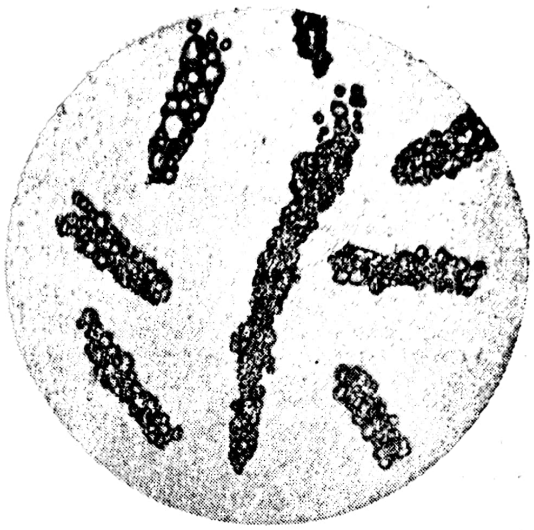
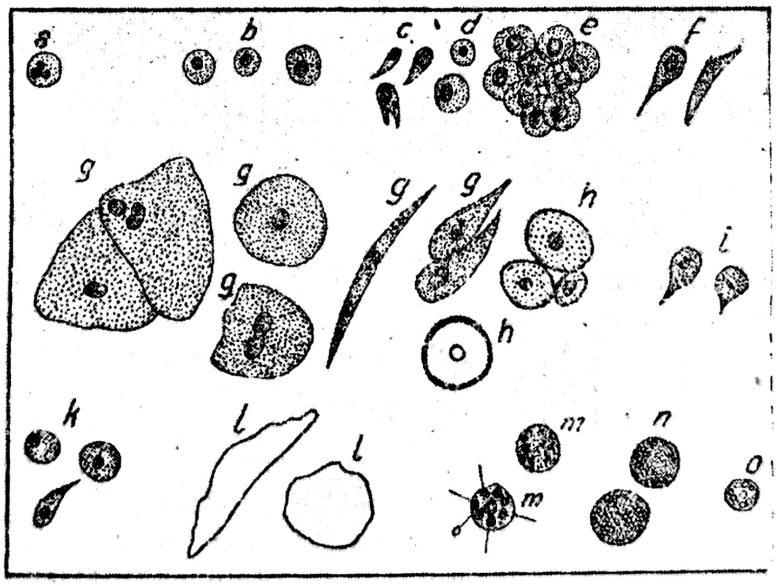


Fig. 174. Cilindri cirozi



a – leucocite; *b* – celule renale; *c* – celule epiteliale superficiale; *d* – celule epiteliale profunde; *e* – celule epiteliale în grupuri; *f* – celule ureterale; *g* – celule epiteliale vezicale; *h* – celule din colul vezical; *i* – celule epiteliale prostatice; *j* – celule uretrale; *k* – celule de descuamare; *l* – celule din tractul seminal; *m* – celule granulare compuse; *n* – celule grase renale.

Fig. 175. Epitelii din diferite segmente ale tractului urinar

SUDOAREA

Sudoarea este un lichid incolor, turbure, cu gust sărat, secretat de glandele sudoripare, a cărui eliminare este dirijată psihic de sistemul nervos central. Există o eliminare vizibilă prin piele și o eliminare invizibilă (perspiratio insensibilis), sub formă de vapori.

Cantitatea de apă eliminată zilnic prin piele este de 800—1 000 cc; în urma unui efort fizic, a ridicării temperaturii, a emoțiilor, volumul eliminat se poate ridica până la 4 litri (s'au înregistrat cazuri cu 15 litri eliminați zilnic).

Greutatea specifică a sudorii este de 1,005—1,013; are Δ crioscopic = = — 0,24—0,42° și pH aproximativ 5 sau mai scăzut.

Sudoarea conține clorură de sodiu 0,3—0,4%, cantități relativ importante de potasiu, conține cantități mici de calciu, magneziu, sulfați, fosfați, alcali (NaOH), mici cantități de proteine; azot total aproximativ 0,5%, în special sub formă de uree (în cazuri de uremie sau în intoxicații cu fosfor apar cristale de uree pe piele), acid uric (a cărui concentrație este mărită în gută), creatinină, acizi aminați printre care predomină serina.

S'au mai pus în evidență: glucoza la diabetici, acetona, acidul lactic care, mai ales după eforturi fizice, este eliminat în cantitate mai mare decât prin urină.

FECALELE

Fecalele sunt formate din resturi alimentare care nu au fost digerate, resturi ale secrețiilor intestinale și digestive, bacterii și produsele lor metabolice, leucocite și descuamații formate din celule epiteliale, săruri alcaline, în special săruri de calciu, fier. In mod anormal poate conține paraziți, calculi pancreatici, calculi biliari, sânge, (hemoragii oculte), leucocite abundente. Bacteriile constitue aproximativ 9% din componentele solide din fecale (*E. coli*, *B. lactis aerogenes*, *Cl. welchii*, *Amylobacter*, etc.). Cantitatea de fecale eliminate în condiții normale de un adult cu alimentație mixtă este de 80—200 g în 24 de ore.

Tabelul 57

Cantitatea și compoziția fecalelor în funcție de alimentație

	Natura alimentației	Greutatea alimentelor în g	Greutatea fecalelor în stare uscată în g	N din fecale în g	N % din fecale în stare uscată
Câine	Post.		2	0,15	7,9
	Carne	500	5,1	0,31	6,5
	„	1 000	7,2	0,55	6,8
	„	1 800	10,3	0,70	7
Om	Post.		2,64	0,14	5
	Alimente fără N	132	5,81	0,24	4,2
	Carne	367	17,2	1,16	6,7
	Ouă.	247	13	0,61	4,7
	Pâine	595	26,2	2,19	8,4

Cantitatea și consistența fecalelor sunt în funcție de alimentație (vezi tabelul 57); o alimentație vegetală provoacă o emisiune mai bogată decât cea lactată sau animală. Postul nu împiedică formarea materiilor fecale.

Reacția fecalelor este în jurul neutralității, cu tendință spre alcalinitate, pH = 7—7,5.

Scanned with OKEN Scanner

Azotul din fecale reprezintă 9% din totalul substanţelor solide şi este în majoritate de origină endogenă (0,5—1 g zilnic).

Lipidele din fecale sunt de natură endogenă, deoarece apar şi în cazul unei alimentaţii lipsite de lipide, iar administrând grăsimi care conţineau deuterium, acesta nu a fost regăsit în grăsimile excretate. Aceste lipide diferă de cele alimentare şi sunt analoage lipidelor din sânge; sunt constituite în special de coprosterol, care derivă din colesterol sub acţiunea bacteriilor intestinale, şi de lecitină. O parte din grăsimile din fecale derivă din alte componente nelipoidice tansformate sub acţiunea bacteriilor, o parte sunt de origină biliară. Calciul, fosfaţii şi magneziul, care intră în constituţia cenuşii, ar proveni din sânge, pe când fierul, din alimentaţie.

Dăm un tabel al compoziţiei chimice a reziduului sec al fecalelor (vezi tabelul 58).

Tabelul 58

Compoziţia reziduului sec al fecalelor

Cenuşă	32,68%
Celuloză	4,80%
Lipide şi nesaponificabile	17,76%
Protide	33,64%
Materii organice nedozate	31,12%

Pigmentul din fecale este în special stercobilinogenul provenit din bilirubină sub acţiunea bacteriilor intestinale.

Mirosul fecalelor este datorit în special indolului şi scatolului, substanţe derivate prin desaminarea şi decarboxilarea triptofanului sub aţiunea bacteriilor intestinale (vezi capitolul aminoacizilor).

Tirozina şi acidul parahidroxifenilpropionic sunt transformate sub acţiunea bacteriilor intestinale în paracrezol şi fenol.

Cantităţi mici de indol, scatol şi fenol sunt absorbite în curentul circulator şi sunt detoxificate în ficat prin conjugare cu acid sulfuric sau cu acid glicuronic.

Indolul şi scatolul, după absorbţie, sunt transformaţi în indoxil, care se combină cu acidul sulfuric şi cu potasiul şi se elimină sub formă de indoxilsulfat de potasiu sau indican, excretat ca atare în urină. Indolul şi scatolul pot fi conjugaţi şi cu acidul glicuronic cu formare de acid indoxilglicuronic şi acid scatoxil glicuronic. In fecale se formează mercaptani şi hidrogen sulfurat prin reacţii de decarboxilare şi desaminare a cisteinei şi metioninei.

In fecale există o serie de enzime. Conţinutul în amilază pancreatică din fecale este considerat ca un indice al activităţii pancreatice. In fecale s'a mai constatat prezenţa tripsinei, renninei, maltazei, zaharazei, lactazei, nucleazei, lipazei.

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL IX

ENERGETICA SUBSTANŢEI VII

GENERALITĂŢI

Energia poate apărea sub diverse forme. Se pot distinge însă două grupe mari, şi anume : energia de poziţie sau *energia potenţială* şi energia de mişcare sau *energia cinetică*. Energia chimică aparţine primei grupe ; căldura, electricitatea, magnetismul, energia radiantă, celei de a doua grupe. Toate formele de energie pot fi însă transformate una în alta. Energia nu poate fi determinată decât prin variaţiile ei. Cu studiul acestora se ocupă termodinamica. Termodinamica studiază legile şi relaţiile care dirijează transformările cantitative ale energiei dintr'o formă în alta, fiecăreia corespunzându-i un echivalent invariabil al altei forme de energie.

Unităţile de măsură ale diverselor forme de energie

Energia calorică sau căldura se măsoară în *calorii*. O calorie mare reprezintă cantitatea de căldură necesară pentru a ridica temperatura unui kg de apă dela 15 la 16° şi se notează cu Cal. Adesea se utilizează o unitate de 1 000 de ori mai mică, aşa numita calorie mică, care reprezintă cantitatea de căldură necesară pentru a ridica temperatura unui gram de apă dela 15 la 16°, şi se notează cu cal.

Energia mecanică sau travaliul mecanic se măsoară în *kilogrammetri*. 1 kilogrammetru = 1 kg m= travaliul necesar pentru a ridica o greutate de 1 kg la o înălţime de un metru.

Energia electrică sau travaliul electric se exprimă în *kilowaţi-oră* (Kh), şi anume prin produsul dintre intensitatea curentului (exprimată în amperi), tensiunea lui (exprimată în volţi) şi durata trecerei curentului (exprimată în ore).

Energia radiantă (lumina vizibilă, ultravioletă, infraroşie, unde hertziene, raze X) se exprimă în *vibraţii pe secundă*.

Relaţiile dintre diversele forme de energie

Fiecărei forme de energie îi corespunde un echivalent invariabil al altei forme de energie. Astfel :

1 Kwh = 860 Cal ; 1 Cal = 427 Kgm.

Adică unui kilowat-oră îi corespund 860 de calorii mari, iar unei calorii mari îi corespund 427 kgm; 860 este echivalentul caloric al travaliului electric, iar 427 este echivalentul mecanic al unei calorii. Acești echivalenți își păstrează valoarea lor, oricare ar fi calea de transformare a energiei electrice în energie calorică sau a energiei calorice în energie mecanică. O reacție chimică se numește *endergonică* când reacția se produce cu consum de energie și *exergonică* când reacția se produce cu eliberare de energie. In general, modificările energetice care întovărășesc reacțiile chimice se exprimă în energie calorică (în calorii).

O reacție chimică se numește *endotermă* când se produce cu consum de căldură și *exotermă*, când se produce cu eliberare de căldură.

Cantitatea de căldură produsă în reacțiile chimice se măsoară cu *calorimetrul* (pentru principiul bombei calorimetrice vezi manualele de fizică).

Ecuația termochimică este o ecuație chimică obișnuită, complectată însă cu valoarea numărului de calorii consumate sau eliberate în reacția chimică exprimată în această ecuație. De exemplu, $C + O_2 = CO_2 + 97\,000$ cal, unde C și O_2 sunt greutățile moleculare exprimate în grame.

Principiile termodinamicii

Cele două principii ale termodinamicii se aplică și celulei vii; deaceea, pentru cercetarea problemelor bioenergetice este necesară cunoașterea acestora.

Principiul întâi al termodinamicii, *principiul conservării energiei*, afirmă că atunci când o anumită formă de energie dispare trebue să apară o cantitate riguros echivalentă a unei alte forme de energie. In transformările de energie dintr'o formă în alta, energia nici nu se pierde și nici nu se creează.

Principiul al doilea al termodinamicii se referă la *transformările energiei calorice în alte forme de energie*. Energia calorică nu se poate transforma niciodată total în travaliu și condiția de transformare a căldurii în travaliu e dată de principiul al doilea al termodinamicii (principiul Carnot—Clausius).

Nu se poate face o transformare de căldură în travaliu decât dacă această căldură trece dela un nivel de temperatură mai ridicat la un nivel de temperatură mai coborît.

Nu se poate face o transformare a energiei calorice în travaliu dacă există o singură sursă de căldură. Trebue să existe cel puțin două surse de temperatură diferite pentru ca o anumită cantitate de căldură să fie cedată de sursa cu cantitate mai mare de căldură sursei cu cantitate mai mică. Transformarea căldurii în travaliu e în funcție de temperatură și principiul al doilea a fost enunțat de Clausius astfel: căldura nu poate trece dela sine de pe un corp mai rece pe un corp mai cald; aceasta înseamnă că în orice fenomen în care se produce căldură are loc o scurgere de căldură de pe corpul mai cald pe cel mai rece și că acest proces nu poate fi complect reversibil. Prezența energiei calorice în sine nu este suficientă pentru a transforma căldura în travaliu., ci mai implică existența unei tensiuni de temperatură. Deci și la căldură, ca la orice formă de energie, este necesar un factor de capacitate (cantitatea) și un factor de intensitate (temperatura). Niciodată căldura nu poate

Scanned with OKEN Scanner

fi transformată dela sine în travaliu fără aport de energie exterioară. Dacă un sistem are o cantitate de căldură Q_1 la temperatura T_1, cedând o cantitate de căldură Q_2 la temperatura T_2, cantitatea de căldură cedată va fi $Q - Q_2 = Q$. Câștigul de travaliu A va fi dat de relația: $A = Q \frac{T_1 - T_2}{T_1}$, deci va depinde de diferența temperaturilor inițiale și finală divizată prin temperatura inițială. Temperatura inițială va fi totdeauna mai mare decât aceea finală, deoarece există, un consum de energie; $\frac{T_1 - T_2}{T_1}$ este o fracțiune subunitară și, deci, A va fi mai mic decât Q.

Transformarea reversibilă și ireversibilă. O transformare se numește *reversibilă* când, pentru a reveni dela starea finală la cea inițială, toată seria de transformări care au fost necesare pentru a trece dela starea inițială la cea finală se desfășoară în mod riguros invers.

O transformare se numește ireversibilă când pentru a trece dela starea finală la cea inițială calea nu este riguros identică cu aceea care a fost străbătută pentru a trece dela starea inițială la aceea finală. Toate fenomenele naturale se petrec într'un singur sens și, conform definiției de mai sus, sunt procese ireversibile. Orice proces natural cuprinde procese parțiale în care energia trece printr'un proces de degradare și nu mai poate fi retransformată în energie de intensitate mare; rămân astfel mereu procese ireversibile. Se poate însă ca evitând cât mai mult condițiile de ireversibilitate să se tindă spre o apropiere de starea de reversibilitate, fără însă a o putea atinge complect, fenomenul principal rămânând mereu inreversibil. Dintre toate transformările posibile, transformarea reversibilă e aceea care degradează cel mai puțin energia în căldură.

Transformare izotermă se numește o transformare care are loc fără variații de temperatură.

Transformarea monotermă este o transformare care are loc cu o singură sursă calorică la o temperatură dată, de exemplu, cazul celulei vii în mediul ambiant.

Energia liberă și energia legată. Se definește ca *energie liberă* (F) fracțiunea de energie care poate fi transformată în oricare altă formă de energie, deci în travaliu. Dacă o reacție este realizată izoterm și reversibil, întreaga energie liberă poate fi transformată în travaliu, devenind travaliul maxim al unui proces. In procesele incomplect reversibile nu se realizează acest travaliu maxim, ci o fracțiune din energia liberă este transformată în căldură.

Energia liberă este măsura capacității de travaliu.

Energia legată este fracțiunea de energie care apare la orice transformare de energie numai sub formă de căldură.

Importanța principiilor termodinamicii în biologie

Celula vie este o mașină chemodinamică care transformă energia chimică în travaliu și căldură, iar capacitatea de travaliu depinde de energia liberă și nu de energia totală.

Principiul întâi al termodinamicii, principiul conservării energiei, se aplică și celulei vii. Astfel, dacă în mușchiul în repaus se arde un kg de glucoză, se degajează o cantitate de căldură egală cu 3 750 calorii. In

mușchiul în contracție, deci în care se produce un travaliu, se regăsesc 2 500 calorii sub formă de căldură și 1 250 calorii sub formă de travaliu, adică 427 kilogrammetri pentru o calorie (randamentul fiind de 1/3, mai mare chiar decât în cazul arderii unui kg de cărbuni care, arzând ca atare, produce 8 000 calorii, iar în mașina cu vapori degajează 7 200 calorii sub formă de căldură și numai 800 sub formă de travaliu, randament 1/10, deci).

Principiul al doilea al termodinamicii este valabil pentru toate procesele care se petrec liber în celulă. Fenomenele chimice, în toate celulele vii, determină în mod permanent o transformare a energiei chimice în travaliu și căldură. Proporția acestor două forme de energie este condiționată de energia liberă și aceasta constitue măsura capacității de travaliu.

In procesele reversibile, travaliul va fi maxim, aceste procese degradând cel mai puțin energia sub formă de căldură. In celulă, însă, în realitate, procesele sunt departe de cele ideale ale reversibilității, astfel că, în mod permanent, alături de travaliu rezultă și căldură în destul de mare cantitate. In mod continuu are loc deci o degradare de energie. O valorificare a căldurii rezultate în mod ireversibil nu există în organism, căldura fiind difuzată sub formă de căldură difuză.

Permanent deci, pierderea de energie degradată sub formă de căldură trebue înlocuită prin aport de energie pe seama reacțiilor reversibile de oxidare (pe seama componentelor glucide, lipide, protide) și pe seama reacțiilor de desfacere a legăturilor puternic energetice din moleculele metabolitelor (legături de tipul legăturilor fosfat puternic energetice ~(P).

Viața, cu toate manifestările ei (producere de mișcare, travaliu mecanic, degajare de căldură, etc.) nu poate să se mențină decât cu condiția ca celulele să găsească o sursă permanentă de energie. Această sursă de energie este complect diferită la plantele verzi și la animale.

Plantele verzi pot trăi pe seama substanțelor pur minerale, apa și sărurile din pământ, CO_2 din aer. Frunza verde absoarbe CO_2, îl descompune eliminând oxigenul și fixând carbonul pe care îl folosește pentru sinteza glucidelor. Procesul acesta de transformare este realizat sub influența razelor solare și în prezența clorofilei (procesul de sinteză clorofiliană). Reacția este endotermă, consumatoare de energie. Prin această reacție are loc o deplasare de potențial energetic enormă: 112 cal pentru un mol CO_2.

Unirea CO_2 cu H_2O pentru a forma o moleculă de glucoză se face printr'o reacție care absoarbe 674 Cal, energie care va putea fi eliberată sub formă de travaliu și sub formă de căldură, aceasta din urmă fiind inutilă pentru celulă.

Ființele lipsite de clorofilă (bacterii, ciuperci, animale), incapabile să capteze energia solară, folosesc energia eliberată de reacțiile exoterme care se petrec în celule în cursul proceselor de degradare. Animalele se hrănesc cu glucide, lipide, protide, care provin în ultimă analiză din celule vegetale conținând clorofilă, ființele lipsite de clorofilă neputând sintetiza endogen aceste componente.

Celulele animale ard glucidele, lipidele, protidele cu ajutorul oxigenului din aer și aceste combustii exoterme eliberează energia necesară vieții, necesară travaliului celular. Se pune întrebarea ce fel de travaliu trebue să realizeze celula pentru a se putea menține? O parte din acesta este travaliu chimic, adică refacerea substanțelor distruse prin uzură

sau necesare creşterii, o parte constitue travaliu mecanic, o parte travaliu fizico-chimic multiplu, travaliu osmotic, travaliu de imbibiţie, travaliu electric, sub formă de tensiune de ionizare, de potenţial, de limite de faze, de curente bioelectrice.

Pe seama energiei chimice se formează o energie potenţială, apoi aceasta realizează un travaliu. Capacitatea de travaliu se realizează numai atunci când se creează în sistem un desechilibru, şi e cu atât mai mare cu cât sistemul e mai îndepărtat de starea de echilibru. Desechilibrul tinde permanent să se egaleze prin realizare de travaliu, dar, deoarece procesele sunt parţial ireversibile, numai o parte din desechilibrele existente sunt echivalate şi obţinerea energiei de degradare oxidativă, care la glucide şi grăsimi duce la CO_2 şi H_2O, respectiv formarea apei, pune la dispoziţie întreaga energie acumulată în aceste combinaţii. Reacţia $2\,H_2 + O_2 = 2\,H_2O$ este singura reacţie care dă complect energie totală (am văzut că formarea CO_2 este datorită unui proces de decarboxilare care se petrece fără cădere de energie).

Degradarea energetică este exclusiv o recombinare a H_2 cu O_2; întreaga energie a degradării biologice este astfel acumulată în oxidarea hidrogenului din substrat de către oxigenul din aer. Bogăţia mare în hidrogen a substanţelor organice face ca aceste substanţe să constitue surse energetice importante pentru celule. Este astfel necesar, pentru studiul metabolismului energetic, să se cunoască valoarea energetică, respectiv valoarea ca'orică, a componentelor de bază din alimentaţie.

Valoarea calorică a alimentelor

Din valoarea O_2 consumat sau a CO_2 eliberat în arderea unui aliment se poate calcula — pentru un aliment dat — valoarea lui calorică, respectiv valoarea energetică.

Rubner determină căldura de combustie a celor trei tipuri de alimente glucide, lipide şi protide, în bomba calorimetrică — deci când alimentele sunt arse în afara organismului-, precum şi căldura eliberată în interiorul organismului prin arderea aceloraşi substanţe (experienţe făcute pe câine prin calorimetrie). Valorile găsite în cazul combustiei în afara organismului sunt următoarele:

1 g glucide	eliberează	aproximativ	4,1 Cal
1 g lipide	„	„	9,3 Cal
1 g proteine	„	„	5,3 Cal

In cazul combustiei în organismul animal, valorile pentru glucide şi lipide rămân aceleaşi, iar valorile pentru proteine sunt mai scăzute (4,1 Cal în loc de 5,3 Cal). Aceasta este *valoarea calorică fiziologică* a proteinelor. Diferenţa se explică prin faptul că proteinele, spre deosebire de glucide şi lipide, nu sunt complect oxidate în organism, până la CO_2 şi H_2O. Azotul din proteine este eliminat în urină sub forma diverşilor compuşi azotaţi, care conţin şi ei o anumită fracţiune din energia totală înglobată în molecula proteinei. Trebue precizat deasemenea că valorile calorice ale diverselor tipuri de glucide — respectiv proteide — nu sunt absolut identice între ele. Astfel, amidonul are o valoare calorică de 4,20, glucoza 3,96, iar proteinele animale au o valoare calorică mai mare decât cele vegetale.

Scanned with OKEN Scanner

Rubner, hrănind animale (câini) cu cantități cunoscute de alimente a căror valoare calorică a fost în prealabil determinată prin calcul din cifrele de mai sus, constată că valorile obținute pentru căldura eliberată

Tabelul 59

Comparație între valorile valorice ale alimentelor determinate direct și valorile calorice eliberate de organism

Alimente	Numărul zilelor	Căldura calculată cal.	Căldura determinată direct cal.	Diferența în procente
Inaniție	5	1 296,3	1 305,2	— 1,42
	2	1 091,2	1 056,6	
Grăsime	5	1 510,1	1 498,3	— 0,97
Carne și grăsime	8	2 492,4	2 488,0	
	12	3 985,4	3 058,4	
Carne	6	2 249,8	2 276,9	— 0,42
	7	4 780,8	4 769,3	+ 0,43

de animal și valorile calorice calculate coincid și demonstrează astfel valabilitatea principiului conservării energiei și la organismele vii (vezi tabelul 59).

COEFICIENTUL RESPIRATOR

Coeficientul respirator (C.R) este definit ca fiind raportul dintre CO_2 eliminat și O_2 consumat în arderea unei substanțe oarecare:

$$\frac{CO_2}{O_2} = \text{C.R.}$$

Volumele relative ale oxigenului consumat și bioxidului de carbon eliminat variază pentru fiecare tip de alimente (glucide, lipide, protide) din cauza conținutului diferit în oxigen și carbon al moleculei respective. Cunoașterea raportului CO_2/O_2 poate duce astfel la identificarea naturii alimentelor din care derivă căldura produsă de un organism animal. Deasemenea, din cunoașterea CO_2 eliminat, a O_2 consumat și a coeficientului respirator se poate determina contribuția fiecărui tip de aliment la transformările energetice care au loc în organism. Vom vedea care sunt valorile coeficientului respirator pentru cele trei tipur de alimente.

Arderea glucidelor (glucoza). Ecuația care reprezintă oxidarea glucozei este: $C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 = 6\,CO_2 + 6\,H_2O$.
Deci sunt 6 volume de oxigen inspirate și 6 volume de CO_2 expirate. Pentru oxidarea hidrogenului din molecula glucozei nu este necesar oxigenul exterior: pentru fiecare CO_2 format se absoarbe o moleculă de O_2.

Coeficientul respirator în cazul glucidelor va fi:

$$\text{C. R.} = \frac{6\,CO_2}{6\,O_2} = 1.$$

In metabolizarea a 100 g glucoză sunt necesari 75 litri O_2 și se formează 75 litri CO_2. $\text{C.R.} = \frac{75}{75} = 1$.

Arderea lipidelor (trioleina). In combustia trioleinei, $C_3H_5(C_{18}H_{33}O_2)_3$, bogată în C și H, dar săracă în oxigen, este necesar un aport mai mare de oxigen.

$C_{57}H_{104}O_6 + 80\ O_2 = 57\ CO_2 + 52\ H_2O$. Coeficientul respirator al trioleinei este deci $\frac{57}{80} = 0{,}71$.

Arderea a 100 g lipide necesită 200 litri oxigen și produce 142 litri CO_2 și aproximativ 110 g apă. C.R. $= \frac{142}{200} = 0{,}71$. Pentru tripalmitină, C.R. = 0,703. In medie, coeficientul respirator pentru lipide variază între 0,703—0,710.

Valoarea coeficientului respirator pentru diversele tipuri de alimente variază în anumite limite; totuși, ea este luată în considerare ca un indicator al tipului de aliment.

O valoare a C.R. în jurul unității arată că alimentul folosit este în special glucidic; o valoare în jurul lui 0,70 semnalează utilizarea unui aliment în special lipidic.

Pentru *proteine*, care conțin o cantitate de oxigen intermediară între glucide și lipide, coeficientul respirator va avea o valoare intermediară (0,80).

Valoarea coeficientului respirator a fost luată drept criteriu indicator al tipului de alimentație metabolizată în organism.

Dacă în organism se metabolizează un singur tip de aliment, acesta se poate ușor identifica; anume, dacă C.R. = 1, alimentul este de tip glucidic, dacă C.R. = 0,707, alimentul este de tip lipidic.

Tabelul 60

C. R.	Calorii per litru O_2	Calorii derivate din Glucide %	Calorii derivate din Grăsimi %	C. R.	Calorii per litru O_2	Calorii derivate Glucide %	Calorii derivate Grăsimi %
0,707	4,686	0	100	0,86	4,875	54,1	45,0
0,71	4,690	1,10	98,9	0,87	4,887	57,5	42,5
0,72	4,702	4,76	95,2	0,88	4,899	60,8	39,2
0,73	4,714	8,40	91,6	0,89	4,911	64,2	35,8
0,74	4,727	12,0	88,0	0,90	4,924	67,5	32,5
0,75	4,739	15,6	84,4	0,91	4,936	70,8	29,2
0,76	4,751	19,2	80,8	0,92	4,948	74,1	25,9
0,77	4,764	22,8	77,2	0,93	4,961	77,4	22,6
0,78	4,776	26,3	73,7	0,94	4,973	80,7	19,3
0,79	4,788	29,9	70,1	0,95	4,985	84,0	16,0
0,80	4,801	33,4	66,6	0,96	4,998	87,2	12,8
0,81	4,813	36,9	63,1	0,97	5,010	90,4	9,58
0,82	4,825	40,3	59,7	0,98	5,022	93,6	6,37
0,83	4,838	43,8	56,2	0,99	5,035	96,8	3,18
0,84	4,850	47,2	52,8	1,00	5,047	100,0	0
0,85	4,862	50,7	49,3				

Dacă se metabolizează un amestec de lipide și glucide, C.R. are valori intermediare, mai apropiate de 1 când predomină glucidele și mai apropiate de 0,70 când predomină lipidele (vezi tabelul 60).

După valoarea C.R. se poate oarecum stabili proporția acestor componente într'un amestec metabolizat în organism, dacă se introduc în calcul diferența dintre valorile celor doi coeficienți respiratori (0,293) (vezi tabelul 61).

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 61

Procentul ars de		Coeficientul respirator	
Glucide	Lipide	C. R.	
100	0	1	1 — 0 × 0,0293
90	10	0,9707	1 — 1 × 0,0293
80	20	0,9414	1 — 2 × 0,0293
70	30	0,9121	1 — 3 × 0,0293
60	40	0,8828	1 — 4 × 0,0293
50	50	0,8535	1 — 5 × 0,0293
40	60	0,8242	1 — 6 × 0,0293
30	70	0,7949	1 — 7 × 0,0293
20	80	0,7656	1 — 8 × 0,0293
10	90	0,7363	1 — 9 × 0,0293
0	100	0,7070	1 — 10 × 0,0293

Unui coeficient respirator cu valoarea 0,8535 îi corespund 50% glucide și 50% lipide.

Coeficientul respirator neproteic

Redă numai proporțiile în care se găsesc glucidele și lipidele. Valoarea acestui coeficient a fost obținută prin determinarea valorii oxigenului total consumat și a CO_2 produs prin arderea unui aliment mixt, din care se scade valoarea corespunzând volumului acestor gaze consumate și eliminate în degradarea numai a proteinelor din alimentație. Cum s'a amintit anterior, pentru proteine nu este însă suficientă determinarea CO_2 și O_2, deoarece o parte din energie este pierdută în eliminarea urinară și prin fecale astfel că este necesară determinarea azotului urinar și a azotului din fecale. Fiecare gram de azot fiind echivalent cu 6,25 grame proteine, se multiplică valoarea azotului cu 6,25 și se obține valoarea proteinelor metabolizate. Fiecare gram de N urinar corespunde unei producteri de 4,76 litri CO_2, unui consum de 5,94 litri oxigen și unei degajări de 26,5 cal. Dacă un individ produce, pe oră, 13,50 litri CO_2, consumă 16 litri oxigen și excretă 0,5 grame N în urină, CO_2 format în metabolismul proteinelor va fi $0,5 \times 4,76 = 2,38$ litri, iar oxigenul consumat în acelaș proces va fi $0,5 \times 5,94 = 2,97$ litri.

Producerea de CO_2 neproteic va fi deci $13,50 - 2,38 = 11,12$ litri. Consumul de O_2 neproteic va fi deci $16,00 - 2,97 = 13,03$ litri și deci coeficientul respirator neproteic:

$$\frac{CO_2}{O_2} = \frac{11,12}{13,03} = 0,85$$

Valorile de O_2 necesare arderii a 1 g din diversele componente și CO_2 corespunzător sunt date în tabelul următor (vezi tabelul 62).

Tabelul 62

Natura substanței 1 g	O_2 consumat		CO_2 format		Coeficient respirator	Calorii formate în kg-Cal	Valoarea calorică	
	g	cc	g	cc	—	—	1 lit. O_2 în kg. Cal	1 lit. CO_2 în kg Cal
Glucide . .	1,185	828,8	1,63	828,8	1,0	4,183	5,047	5,047
Lipide. . .	2,887	2 019,3	2,81	1 423,3	0,707	9,461	4,686	6,629
Protide. . .	1,382	966,3	1,52	723,9	0,801	4,316	4,485	5,576

Scanned with OKEN Scanner

Echivalenți termici

Echivalentul caloric al oxigenului. Se numește *echivalent caloric al oxigenului* cantitatea de *calorii pe care o eliberează 1 litru de oxigen care arde în organism.* Pentru a transforma volumul de O_2 consumat într'un proces de metabolism oxidativ, în energie calorică, se multiplică volumul de oxigen cu echivalentul caloric al oxigenului.

Valoarea echivalentului caloric al oxigenului variază însă cu valoarea coeficientului respirator al substanței oxidate. 1 litru oxigen utilizat în catabolismul glucidic corespunde la 5 047 Cal, deci echivalentul caloric a 1 litru oxigen este de 5 047 Cal, când se ard glucide și coeficientul respirator este egal cu 1; pentru lipide este de 4 655 Cal, când coeficientul respirator este egal cu 0,704.

Aceste diferențe ale echivalentului caloric pentru oxigen în raport cu substanța care este oxidată se explică prin conținutul diferit al substanței respective în oxigen. Astfel, glucidele care conțin mai mult oxigen în moleculă vor produce pentru același consum de oxigen din exterior mai multă căldură pe unitatea de volum de oxigen consumat decât lipidele componente mai sărace în oxigen. Pentru proteine, echivalentul caloric al oxigenului este de 4,485 Cal. Echivalentul caloric al oxigenului va fi în funcție de valoarea coeficientului respirator, deci în funcție de alimentele metabolizate oxidativ. Valoarea calorică sau echivalentul caloric al oxigenului corespunzător diverselor valori ale coeficientului respirator al amestecurilor de glucide și lipide în proporții variabile este dată de Zunz și Schumburg și modificată de Lusk, în tabelul 62.

In acest tabel sunt date procentele de lipide și glucide care sunt arse, coeficienții respiratori ai amestecurilor respective și numărul de calorii corespunzătoare arderii acestui amestec de către 1 litru oxigen. Aceste date permit calculul producerii de căldură și determinarea exactă a cantității de glucide și lipide arse în organism într'un interval dat. Tabelul indică, de exemplu, pentru un C.R. neproteic egal cu 0,85 un echivalent caloric de 4 862. Luându-se valorile din exemplul dat pentru calculul coeficientului neproteic se constată: căldura produsă în arderea compușilor neproteici este: 13,03 × 4 862 = 68,3 Cal, din care 50,7% derivă din glucide și 49,3% din lipide. Căldura produsă de proteine este: 2,97 × × 4 485 = 13,3 Cal (echivalentul caloric pentru fiecare gram de N urinar fiind 26,51). Căldura totală produsă pe oră este deci:

68,3 + 13,3 = 76,6 Cal. Din acestea, 42% provin din glucide, 41% din grăsimi și 17% din proteine.

Din valorile energetice introduse cu alimentația rămâne mereu o porțiune neutilizată, care se pierde prin fecale, prin urină (prin eliminarea unei serii de componente energetice: uree, acid uric, baze purinice, creatinină).

Se numește *coeficient caloric urinar*, raportul valorii termice față de azotul urinar. In tabelul următor sunt date valorile acestui coeficient pentru diversele alimente (vezi tabelul 63).

Tabelul 63

Alimentul	Coeficient caloric pentru 1 g urină
Lapte matern	12,1
Lapte de vacă	6,9
Alimentație mixtă săracă în grăsimi	8,4
Alimentație mixtă bogată în grăsimi	8,6
Carne	7,7
Cartofi	7,7

Pierderile energetice prin componentele organice din fecale și valoarea utilă fiziologică sunt date în tabelul 64.

Tabelul 64

Alimentul	Pierderea de energie în procente		Valoarea utilă fiziologică în procente
	Fecale	Urină	
Lapte de vacă	5,07	5,13	89,8
Alimentație săracă în grăsimi	5,73	3,87	90,4
Alimentație bogată în grăsimi	6,00	4,65	89,3
Cartofi	5,60	2,00	92,3
Carne	6,90	16,30	76,8
Pâine	15,50	2,4	82,1
Pâine de secară	24,30	2,2	73,5

Cheltuiala de energie pentru diversele funcții este dată în tabelul 65.

Valorile date în acest tabel corespund cheltuielilor energetice la un individ adult, la o temperatură și umiditate medie a aerului înconjurător.

Tabelul 65

Funcția	Cheltuiala de energie în kg–Cal	În procente din cheltuiala totală de căldură	
Respirație	35	1,30	4,73
Muncă	51	1,88	
Încălzirea aerului respirat	42	1,55	
Evaporarea apei prin piele	558	20,7	
Încălzirea aerului înconjurător	833	30,85	
Iradiere de pe suprafața corpului	1 181	43,75	
Total	2 700	100 %	

Modificări exterioare și inferioare organismului aduc după ele modificări esențiale ale valorilor respective.

Pentru o activitate fără efort muscular se socotesc ca necesare 2 400 Kg-Cal pentru 24 de ore. Acestea reprezintă metabolismul energetic de repaus. După alimentare, metabolismul energetic crește cu 15%, iar dacă are loc și un travaliu, creșterea este mai mare.

Relația dintre necesitatea energetică și travaliu este redată în tabelul 66.

Legea izodinamiei, enunțată de Rubner (1885), arată că diversele alimente pot fi înlocuite unele prin altele dacă se iau în considerare cantitățile respective care produc aceeași căldură.

Glucidele degradate în organism degajează 3,88 calorii pe gram, protidele 3,68, lipidele 8,65 calorii/gram.

Tabelul 66

Mărimea travaliului	Necesitatea energetică în kg–Cal		
	Pentru metabolismul de repaus	Pentru travaliu	Pentru metabolismul energetic total
50 000	2 400	600	3 000
100 000	2 400	1 200	3 600
150 000	2 400	1 800	4 200
200 000	2 400	2 400	4 800

Scanned with OKEN Scanner

Primele se pot deci înlocui unele cu altele în aceleași proporții, pe când lipidele trebue înlocuite cu o cantitate mai mare de glucide sau de protide. 1 g, lipide echivalează deci cu 8,65 : 3,88 = 2,33 g glucide și cu 8,65 : 3,68 = = 2,35 g protide.

Pentru diverse alimente s'a constatat că

100 grame grăsimi
250 „ amidon
234 „ zahăr
243 „ carne uscată

produc, atunci când sunt ingerate, aceeași cantitate de căldură — sunt ceeace se numește *izodinamice.*

METABOLISMUL ENERGETIC

Energetica substanței vii cercetează căile și mecanismele prin care energia chimică, potențială, din componentele nutritive este transformată în energie activă, necesară funcțiilor celulare. Energetica substanței vii trebue să cuprindă studiul transformărilor materiilor vii și schimburile energetice corespunzătoare, deoarece componentele chimice din alimentație, în afară de rolul lor de menținere și reînnoire a substanțelor structurale, au și rolul fundamental de procurare a energiei folosite în toate procesele vieții. Energetica trebue să cerceteze mecanismele și căile care duc la energie chimică latentă, depozitată în compușii chimici, la energia activă și să stabilească raporturile cantitative existente între diversele forme de energie.

Reacțiile producătoare de energie necesară activității vitale se termină prin combustii oxidative și pot fi astfel măsurate prin oxigenul consumat. Natura și amploarea oxidărilor chimice condiționează cantitatea de energie produsă în organism, și este posibil a determina producerea de energie din analiza reacțiilor chimice care au loc.

Lavoisier (1743—1794) a arătat că în organismul animal unirea oxigenului cu carbonul și hidrogenul duce la formarea de CO_2, H_2O și producere de căldură, și a demonstrat că această căldură este rezultatul oxidării carbonului. Prin experiențe rămase clasice, Lavoisier demonstrează paralelismul dintre cantitatea de căldură produsă în organismul animal și cantitatea de CO_2 eliminată, arătând în acelaș timp că CO_2 produs în organismul animal este întovărășit de aceeași degajare de căldură ca și aceeași cantitate de CO_2 produsă „in vitro" prin arderea unei substanțe oarecare conținând carbon. Lavoisier face să ardă într'un calorimetru o lumânare și măsoară produsele de combustie și căldura degajată; introduce apoi în acelaș calorimetru un cobai, în locul lumânării; găsește în ambele cazuri că aceeași cantitate de energie degajată (determinată prin cantitatea de ghiață topită care înconjoară calorimetrul) corespunde aceleiași cantități de CO_2 format.

METODELE DE STUDIU ALE METABOLISMULUI ENERGETIC

Sursele energetice importante pentru animale sunt glucidele, lipidele, proteinele, compușii care pot fi transformați în aceste substanțe, produsele lor intermediare. Produsele finale ale oxidării complecte a glucidelor și

lipidelor sunt CO_2 şi H_2O, ale proteinelor CO_2, H_2O şi ureea, precum şi acidul sulfuric şi fosforic, pentru cele ce conţin S şi P în moleculă. CO_2 este excretat prin aparatul respirator, apa prin urină, piele, plămân, produsele de oxidare ale S, P şi N prin urină. Oxigenul necesar oxidării pătrunde în organism prin plămân. Oxigenul consumat poate fi socotit ca o măsură a transformărilor care au loc în organism, iar ca măsură a energiei degajate în aceste reacţii se poate lua cantitatea de căldură degajată, deoarece principiul întâi al termodinamicii, principiul conservării energiei, se aplică şi organismului viu; conform lui, o formă de energie poate fi transformată în alta. Procesele oxidative în organism şi producerea de energie sunt strâns legate. *Studiul energetic al fenomenelor biologice se poate astfel urmări, fie prin determinarea producerii de căldură în organism, fie prin determinarea volumului de oxigen consumat, respectiv a CO_2 eliminat.* Aceste două căi sunt folosite în metodele de determinare a metabolismului energetic general, şi anume, în metoda *„calorimetriei directe"*, în care se măsoară căldura actuală, şi în metoda *„calorimetriei indirecte"* sau metoda respiratorie indirectă, în care se calculează producerea de căldură din oxigenul absorbit şi CO_2 eliminat.

METODA CALORIMETRIEI DIRECTE

In metoda calorimetriei directe se determină căldura eliminată de un individ, atât prin radiere, cât şi prin evaporarea apei prin piele şi prin eliminare prin plămân. In această metodă, individul în experienţă este introdus într'o cameră izolată ermetic faţă de variaţiile de temperatură şi umiditate exterioare şi se determină căldura degajată în timpul experienţei, măsurând creşterea temperaturii camerei calorimetrice. Cu această metodă s'a putut dovedi valabilitatea legii conservării energiei la fiinţele vii. Un om poate trăi într'un asemenea calorimetru mai multe zile; aci poate mânca, lucra, face exerciţii fizice. Dispozitive speciale, permit determinarea căldurii emise şi recoltarea tuturor produselor de eliminare, precum şi determinarea travaliului mecanic efectuat. O analiză chimică prealabilă a tuturor alimentelor ingerate face posibilă calcularea energiei potenţiale introdusă cu aceste alimente. Astfel, într'o experienţă făcută pe un om tânăr menţinut timp de 3 zile în această cameră calorimetrică, alimentele introduse au reprezentat un aport de 5 680 calorii, iar căldură emisă a fost găsită 5 689 calorii (deci o eroare extrem de mică), ceeace indică valabilitatea legii conservării energiei. Cu această metodă s'a dovedit că în procesul de creştere, de neoformare a substanţei vii, se aplică legea conservării energiei.

Pentru determinările curente, metoda calorimetriei directe este însă neaplicabilă, cerând instalaţii costisitoare şi fiind destul de delicată; deaceea, pentru studii clinice se foloseşte a doua metodă.

CALORIMETRIA INDIRECTĂ SAU CALORIMETRIA RESPIRATORIE

In calorimetria indirectă se calculează căldura produsă de organismul viu, din valoarea volumelor de O_2 consumat şi de CO_2 eliberat, ştiind că 1 g de glucide produce 4,1 Cal, 1 g de lipide 9,3 Cal, 1 g de protide 4,1 Cal.

Tabelul 67 indică pentru aceste tipuri de alimente O_2 consumat, CO_2 degajat, caloriile formate şi valoarea calorică la 1 litru.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 67

1 g	O_2 consumat cc	CO_2 degajat cc	Calorii formate	Valoarea calorică la 1 litru	
				O_2	CO_2
Albumină	966,3	773,9	4,316	4,485	5,567
Grăsimi	2 019,3	1 427,3	9,461	4,686	6,629
Amidon	828,8	828,8	4,182	5,047	5,047

Aparatele folosite în această metodă, sunt de două tipuri :

a) *aparate cu circuit deschis* și

b) *aparate cu circuit închis.*

a) In aparatele cu *circuit deschis*, aerul inspirat din atmosfera exterioară este expirat într'un sistem receptor adecvat (spirometru) o anumită perioadă de timp și se determină proporția de O_2 și CO_2. Se scade oxigenul expirat din oxigenul atmosferic și se obține oxigenul consumat, iar pentru CO_2, se scade din CO_2 expirat, CO_2 inspirat.

b) *In aparatele cu circuit închis* (fig. 176) se inspiră într'un circuit închis oxigenul dintr'un spirometru și se expiră în același circuit prevăzut cu un recipient cu calce sodată, unde CO_2 expirat este absorbit. Din denivelarea spirometrului se calculează oxigenul consumat. Metoda este simplă și rapidă, dar nu absolut precisă. Volumul de oxigen consumat înmulțit cu coeficientul caloric al oxigenului reprezintă valoarea cantității de calorii degajate.

Metabolismul bazal

Necesitatea energetică a organismului se compune din energia de întreținere + energia pentru realizarea de travaliu. O celulă, chiar în stare de repaus complect, continuă să fie sediul unei respirații intense și degajează multă căldură. Când celula intră în activitate (mușchiul care se contractă, glanda care secretă, etc.), producerea de energie de către celulă crește și acest fapt e legat de o creștere a respirației.

Celula în repaus complect are nevoie să aibă în mod continuu la dispoziția ei energie.

Structura fizico-chimică și chimică a materiei vii este un sistem extrem de instabil, un sistem care se poate menține prin

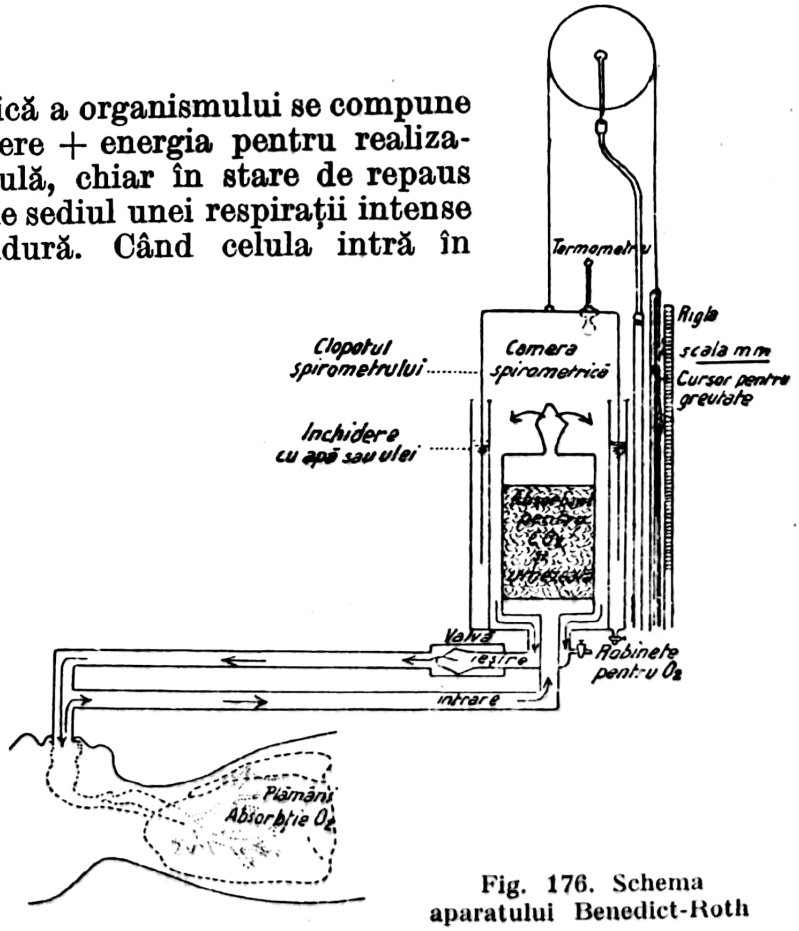


Fig. 176. Schema aparatului Benedict-Roth

sine însuşi, dar care trebue continuu „reparat", şi acest travaliu de continuă reparaţie cere energie. Din această energie cheltuită de celulă în timpul travaliului de reparaţie, numai o mică parte este în adevăr utilizată pentru travaliul de reparaţie. Cea mai mare parte este degajată sub formă de căldură şi astfel se explică producerea de energie, de căldură, de către celula în repaus complect.

Cantitatea totală de energie produsă de organismul animal sau uman variază cu *starea fiziologică* a individului (inaniţie, natura alimentării, travaliul muscular, etc.) şi cu starea sa patologică. Există însă o limită dedesubtul căreia producerea de energie de către organism nu poate fi scăzută. Această energie minimă, de care nu se poate dispensa organismul, chiar în repaus complect, este legată de reacţiile chimice corelate cu reparaţia continuă a structurii celulare, cu travaliul muscular (respiraţia şi circulaţia), cu secreţiile (urinare, de exemplu). Această energie, numită *energie de întreţinere* sau *energie de repaus*, corespunde la ceeace se înţelege sub numele de „*metabolism bazal*" sau „*metabolism de bază*" al organismului.

Se înţelege prin *metabolism bazal, metabolismul energetic al unui organism în repaus complect, după un post de 12—18 ore, repaus corporal absolut, temperatură normală a corpului şi la o temperatură ambiantă de 20°*; deci exprimă producerea de căldură a corpului în repaus fizic şi mental complect şi în stare postabsorbtivă. Metabolismul de bază determină astfel valoarea minimă a schimburilor în condiţii normale.

Determinarea metabolismului bazal

Metabolismul bazal se exprimă în calorii, iar tehnica de determinare e aceea a calorimetriei indirecte. Am văzut înainte în ce constă această tehnică. Metabolismul bazal se determină în următoarele condiţii:

1. individul îmbrăcat uşor, dar acoperit cu două pături de lână, este culcat în stare de repaus complect;
2. temperatura ambiantă = 18—20°;
3. individul nu a ingerat nimic de 14 ore.

In aceste condiţii, la bărbaţi (20—50 de ani), valoarea metabolismului bazal este de 38—48 de calorii pe m^2 de suprafaţă corporală, pe oră.

Metabolismul bazal este diferit la diverşi indivizi. El depinde în primul rând de mărimea şi greutatea corporală, de vârstă, de sex. Metabolismul de bază are o valoare medie de 1 calorie pe kilocorp şi pe oră; la un om de 70 kg în 24 de ore e de aproximativ 1 700 calorii.

Cercetătorii sunt de acord să admită că raportarea metabolismului de bază la unitatea de greutate nu este satisfăcătoare, deoarece, la diverşi oameni, valorile raportate la unitatea de greutate nu concordă deloc între ele. In general, valorile raportate la kg sunt cu atât mai mari cu cât greutatea corporală e mai mare. După Rubner, raportarea la unitatea de suprafaţă (în m^2) este mult mai justă. Acest lucru se explică dacă ne gândim că totalitatea căldurii produse de organism se elimină final din acest organism prin suprafaţa corpului. Cantitatea de căldură necesară pentru a menţine constantă temperatura de 37° a corpului trebue deci să fie proporţională cu această suprafaţă. Intr'adevăr, la om şi la majoritatea animalelor, valoarea căldurii bazale raportată la unitatea de suprafaţă este foarte puţin diferită de *1 400—1 500 calorii pe metru pătrat de suprafaţă pe zi.*

Determinarea exactă a suprafeței corpului este destul de delicată. Au fost date o serie de formule obținute dintr'o serie întreagă de determinări. O calculare mai precisă o permite formula lui Du Bois, care ține seama de greutatea corpului în kg și de înălțime în cm :

$$S = g\,0{,}425 \times I\,71{,}48$$

Suprafața = greutatea în kg × înălțimea în cm
Deasemenea, Du Bois are și o nomogramă care permite determinarea suprafeței corpului (fig. 177).

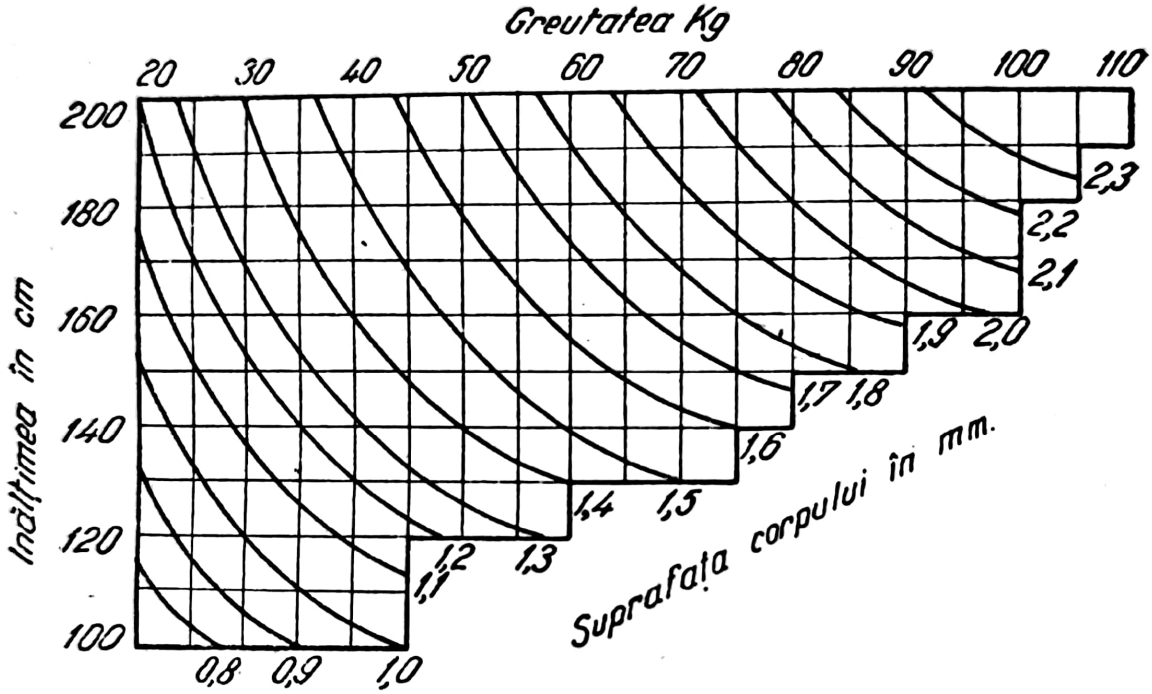


Fig. 177. Nomograma pentru calcularea suprafeței corporale (*Du Bois*).

Metabolismul de bază este în funcție de vârstă și sex, și anume, valoarea metabolismului de bază pe unitatea de suprafață (m^2) devine mai mică cu vârsta și la femei are valori mai mici decât la bărbați.

Dăm în tabelul 68 valorile metabolismului de bază exprimate în calorii pe m^2 și în 24 de ore.

Comparând metabolismul real al unui individ (exprimat în calorii) determinat prin calorimetrie indirectă cu metabolismul normal, dat de tabelul de mai sus vom găsi valori mai mari sau mai mici față de valorile normale.

Variațiile normale sunt în limite de ± 15%. Dacă un individ are un metabolism cu + 40% mai mare decât cel dat în tabelul de valori normale, e vorba de un metabolism bazal crescut. In genere nu trebue să se atribue o semnificație decât variațiilor mai mari de 10—15%.

Tabelul 68

In stări fiziologice normale

Vârsta	Bărbat	Femeie
14—16	1 060	990
16—18	990	920
18—20	940	870
20—30	900	840
30—40	900	830
40—50	880	820
50—60	860	800
60—70	830	770
70—80	810	750

Semnificaţia modificărilor metabolismului bazal

Metabolismul bazal este *crescut până la 60%* în hipertiroidism (Basedow), în febră, în diabet insipid, în afecţiuni cardio-renale cu dispnee, în leucemii, în policitemii. Invers, metabolismul de bază este *scăzut* până la — 50% în hipotiroidism (mixedem, cretinism), în unele insuficienţe hipofizare, în boala lui Addison, în nefroza lipoidică, în unele cazuri de mizerie organică, nefrite, diabet, etc.

Metabolismul energetic (de funcţionare) al organismului

Numeroase cauze fiziologice ridică producţia totală de energie deasupra minimului bazal (care reprezintă tocmai energia de întreţinere). Cele mai importante sunt:

1. *temperatura ambiantă*;
2. *travaliul muscular şi efortul mental*;
3. *ingerarea alimentelor.*

Toţi aceşti factori au acţiune de stimulare asupra metabolismului.

A. Dependenţa de temperatură

Lupta împotriva frigului şi a căldurii. Am văzut că metabolismul de bază exprimă producerea de energie minimă a unui individ în repaus complect şi la o temperatură exterioară medie care este cam de 30° pentru un om desbrăcat, de 15—20° pentru un om îmbrăcat.

Dacă temperatura exterioară scade sub această temperatură, organismul luptă împotriva frigului printr'o exagerare a arderilor, prin intervenţia sistemului muscular: contracţii voluntare sau reflexe, tremurare, care produc căldură. Această luptă împotriva frigului cere o cheltuială de energie cu atât mai mare cu cât frigul este mai mare şi acest lucru se traduce printr'o creştere a consumului de O_2. Este o reglare chimică a temperaturii.

Dacă se ridică temperatura exterioară peste 30°, organismul luptă împotriva căldurii (transpiraţie); această luptă consumă energie, măsurată tot printr'un consum mai mare de O_2. Deci se vede cât de importantă e temperatura exterioară în determinarea metabolismului bazal. Temperatura la care organismul are metabolismul minim se numeşte şi domeniul *neutralităţii termice* (în jurul lui 20°).

Tabelul 69

Căldura bazală produsă pe m² de suprafaţă corporală

Vârsta	Bărbaţi		Femei	
	Calorii pe oră	Calorii pe zi	Calorii pe oră	Calorii pe zi
ani				
10—12	51,5	1 236	50	1 200
12—14	50	1 200	46,5	1 116
14—16	46	1 104	43	1 032
16—18	43	1 032	40	960
18—20	41	984	38	952
20—30	39,5	948	37	888
30—40	39,5	948	36,5	876
40—50	38,5	924	36	864
50—60	37,5	900	35	840
60—70	36,5	876	34	816

Scanned with OKEN Scanner

La animalele a căror temperatură corporală depinde foarte mult de temperatura mediului, animale *poikiloterme*, influența aceasta este importantă. Animalele superioare și omul au o temperatură constantă în limite destul de mici (*homeoterme*).

B. **Dependența de travaliul realizat**

Rolul travaliului muscular. Chiar un exercițiu muscular redus poate crește metabolismul de bază cu 20—60 %, unul moderat cu 100—200%, iar un travaliu muscular intens ridică nivelul energetic, care poate atinge valori de 10 ori mai mari decât cele în repaus complect (vezi tabelurile 70 și 71).

Tabelul 70

Metabolismul de bază	Calorii pe minut
șezând	1,14
stând	1,19
stând relaxat	1,25
stând sprijinit	1,18
stând rigid	1,30
stând, agitând brațele ca la un mers rapid	3,13
O analiză tipică pentru un bărbat de 70 kg este următoarea:	
8 ore de somn	520 calorii
2 „ exerciții ușoare	340 „
8 „ muncă de dulgher	1 920 „
6 „ repaus	600 „

Tabelul 71

Necesitatea energetică în diversele profesii

	Necesitatea energetică în 24 ore exprimată în calorii
Ocupație sedentară (travaliu intelectual)	2 200—2 400
Travaliu muscular ușor (croitor, tipograf, medic)	2 600—2 800
Travaliu muscular mijlociu (travaliu de laborator, cizmar, portar)	3 000
Travaliu muscular mai intens (pictor, tâmplar, etc.)	3 400—3 600
Travaliu muscular intens (zidar, excavator, etc.)	4 000—4 500
Travaliu muscular foarte intens (pietrar)	5 000—6 000

Din acestea, 1 400—1 900 sunt consumate în metabolismul bazal.

Rolul travaliului secretor, intelectual, etc. Toate secrețiile (digestive, sudorale, urinare) consumă energie. Travaliul intelectual, dimpotrivă, consumă foarte puțină energie. Astfel, rezolvarea unor probleme de matematică mărește metabolismul cu numai 3—4%. Emoțiile mari ridică metabolismul cu 5—10%. In timpul somnului, când mușchii sunt relaxați, metabolismul scade sub valorile normale.

Scanned with OKEN Scanner

C. Influența alimentelor

Influența alimentelor asupra metabolismului este fundamentală. Creșterea metabolismului sub acțiunea alimentelor a fost denumită de Rubner acțiune dinamică specifică. Determinarea metabolismului de bază trebue făcută deaceea în condiții postabsorbtive.

Condiții obligatorii la determinarea metabolismului bazal

A se evita :

1. lupta organismului împotriva frigului și a căldurii,
2. alimentația timp de 12—14 ore înaintea determinării metabolismului,
3. travaliul muscular.

Necesitatea energetică a organismului

Necesitatea energetică a organismului este repartizată, pe de o parte, pentru menținerea metabolismului bazal, pe de altă parte, pentru travaliu. Metabolismul de bază include energia necesară respirației, circulației sanguine, contracției intestinale, menținerii tonusului muscular. Necesitatea organismului în creștere este foarte importantă. In acest caz se adaugă necesității energetice corespunzătoare metabolismului de bază și realizării unui travaliu și necesitatea energetică în vederea construirii elementelor necesare creșterii și multiplicării substanței corporale.

In primul an al vieții se utilizează pentru acest scop o mare parte din energia totală transformată. Cu vârsta, necesitatea construirii elementelor constitutive scade. Necesitatea energetică variază cu o serie de factori, metabolismul de bază, vârsta, greutatea, etc.

Acoperirea necesităților energetice

Rolul alimentației. Când unui organism i se aduce prin alimentație o cantitate de energie corespunzătoare metabolismului bazal, se vede totuși că energia obținută e mai mare. Aportul și prelucrarea alimentelor ridică nivelul producerii energetice. In mică măsură, aceasta se explică prin travaliul digestiv (secreție, contracție musculară, etc.) și în mai mare măsură prin reacțiile complexe de asimilare cu metabolismul intermediar al acestora.

Acțiunea dinamică specifică a alimentelor

Acțiunea dinamică specifică a alimentelor, creșterea metabolismului peste cel de bază provocată de aportul de alimente, durează aproximativ *12 ore.* Existența acestei acțiuni explică dece determinările de metabolism bazal trebue făcute la 12—14 ore după ultima ingerare de alimente. Creșterea consumului de oxigen peste nivelul bazal este pentru proteine de 30—40%, de 12% pentru lipide, de 5—6% pentru glucide. Aceasta arată că organismul nu-și va putea menține greutatea cu o rație alimentară corespunzătoare metabolismului de bază.

Considerăm un câine pe nemâncate, în repaus și la o temperatură exterioară de 30°. Găsim că produce o cantitate totală de energie care corespunde la 100 de calorii în 24 de ore. Aceste 100 de calorii le ia din

arderea substanțelor sale tisulare. Dacă îi dăm să ingere pe zi o cantitate de proteine reprezentând 100 de calorii, adică $\frac{100}{4,4} = 23$ g, putem să ne așteptăm ca animalul să producă tot 100 de calorii pe zi, neavând nevoie să consume substanțele sale tisulare. Contrar așteptărilor se vede că animalul produce 130 de calorii pe zi, adică, în afară de cele 100 de calorii aduse de proteinele exterioare, încă 30 de calorii provenite din țesuturile proprii. Pentru ca animalul să nu piardă nimic din țesuturile proprii trebue să i se dea o cantitate de $\frac{130}{4,4} = 30$ g proteine. Aceste 30 g proteine produc, atât în organism, cât și in vitro, 130 de calorii, dintre care numai 100 de calorii sunt utilizate de procesele vitale ale animalului și contează în necesitățile obligatorii ale *cheltuielii de fond* a organismului, iar 30 sunt un adevărat reziduu de energie.

Acelaș lucru în cazul lipidelor; trebue să dăm câinelui 114 calorii pentru a acoperi necesitățile sale de fond de 100 de calorii; cele 14 calorii suplimentare constitue un reziduu de energie. In cazul glucidelor trebue să i se dea câinelui 105 calorii pentru a acoperi cele 100 de calorii pentru necesitățile de fond de 100 de calorii; celelalte 5 constitue un reziduu de energie.

Deci, alimentația adaugă cheltuielii de fond de 100 de calorii o supraproducție de energie variabilă cu alimentele, care reprezintă acțiunea lor dinamică specifică.

Intr'adevăr, e suficient să injectăm în venele unui animal glucoză sau un acid pentru a vedea imediat ridicându-se cheltuiala de energie. Rezultă că în cazul câinelui trebue să dăm 130 de calorii provenind din protide = 114 calorii provenind din lipide = 105 calorii provenind din glucide pentru a avea 100 de calorii realmente utilizabile pentru necesitățile de bază. Pentru fiecare din ele este necesar un plus de energie reziduală eliminată sub formă de căldură care variază dela un aliment la altul. Valoarea calorică a diverselor alimente nu e identică în condiții de temperatură în care energia calorică e utilizată numai pentru acoperirea necesităților de fond (de exemplu, la 30°).

Dacă însă plasăm câinele în experiență la o temperatură de 10°, deci în condiții în care animalul are nevoie să-și acopere, în afară de cheltuiala de energie de bază (de întreținere), și energia necesară luptei împotriva frigului și în acest caz se dau animalului 130 calorii de protide sau 114 calorii de lipide sau 105 calorii de glucide, 100 de calorii vor servi pentru cheltuielile de bază, iar 30 sau 15 sau 5, care în experiența la 30° constituiau un reziduu fără valoare, furnizează în această experiență excesul de căldură necesar organismului pentru a lupta împotriva frigului; astfel, toate caloriile aduse sunt pe deplin utilizate. Caloriile diverselor alimente au aceeași valoare utilă; sunt izodinamice. Diversele substanțe energetice din alimentație pot fi înlocuite unele cu altele atunci când sunt arse în organism în raport cu căldura lor de ardere. După această lege, 1 g grăsimi = 2,27 g proteine sau glucide, sunt energetic identice sau izodinamice.

Această lege nu este riguros valabilă, dar excepțiile sunt minime. Acțiunea dinamică specifică este foarte importantă, căci surplusul de arderi produse împiedică depozitarea și stocarea grăsimilor.

Scanned with OKEN Scanner

Nu este încă lămurită natura şi cauza acţiunii dinamice specifice a alimentelor. Se pare că e vorba de un fenomen foarte general care priveşte materia vie. Când o celulă are la dispoziţie o cantitate de combustibil mai mare, ea îşi ridică intensitatea de combustie, risipeşte astfel combustibilul. Acest lucru este evident în special la microorganisme; când o bacterie sau levură nu are la dispoziţie materialul necesar, îşi arde rezervele celulare cu o mare economie; aceeaşi fiinţă, pusă într'un mediu bogat în materii combustibile, îşi ridică considerabil nivelul arderilor, printr'o exagerare a acţiunii dinamice specifice a alimentelor faţă de ceeace se întâmplă la animale sau om. De exemplu, un om de 70 kg arde, în raport cu activitatea şi alimentaţia sa, 2 000—4 000 calorii zilnic; unele levuri pot arde glucoza în aşa fel, încât 70 kg levură să ardă 200 000 calorii zilnic. Acţiunea dinamică specifică este sub dependenţă neurohormonală, sub dependenţa sistemului nervos vegetativ, care se află la rândul lor sub controlul centrilor hipotalamici influenţaţi de scoarţa cerebrală. Se vede deci cât de importantă e acţiunea alimentaţiei asupra determinării metabolismului de bază şi dece acesta trebue determinat pe nemâncate.

Am spus că glucidele, lipidele, protidele se pot înlocui, în concordanţă cu legea izodinamiei, unele prin altele în alimentaţia animalului. Pentru proteine există o anumită necesitate minimă care nu poate fi înlocuită cu grăsimi sau glucide şi, în afară de aceasta, acţiunea dinamică specifică este cea mai mare pentru proteine. E probabil că acest lucru e în raport cu procesul de desaminare, deoarece acizii aminaţi au o acţiune dinamică specifică de aceeaşi mărime. Pe lângă aceasta este probabil că degradarea şi transformarea mai departe a lanţului carbonic rămas după desaminare sunt legate tot cu o acţiune dinamică specifică, deci de întregul metabolism intermediar proteic.

In „acţiunea dinamică specifică" se oglindeşte totalitatea fenomenelor de degradare şi transformare a metabolitelor.

Deoarece proteinele au un rol aparte, care reise din faptul că există o anumită cantitate minimă de proteine care nu poate fi înlocuită de grăsimi şi glucide, şi din faptul că proteinele au acţiunea dinamică specifică cea mai mare, vom studia mai în detaliu aceste două fenomene.

Minimul proteic şi echilibrul azotat

Este necesar ca o anumită cantitate de energie să fie furnizată neapărat de proteine. Această necesitate nu este dictată pe considerentul energiei specifice a proteinelor, ci pe cel funcţional specific, în special componenţa lor în aminoacizi indispensabili pe care organismul nu-i poate sintetiza.

Componentele proteinice ale celulei suferă continuu transformări. Prin desaminări, creşterea unghiilor, părului, secreţia glandelor, se pierd mereu proteine, astfel că există eliminări de azot chiar într'o alimentaţie lipsită de proteine. Aceste pierderi de N trebue să fie compensate prin aport de proteine în alimentaţie; Rubner numeşte aceste pierderi de proteine „cota de uzaj". Mărimea ei depinde de condiţiile de viaţă; dacă un organism se alimentează caloric suficient sau mai mult decât suficient cu glucide, atunci această cotă de uzaj are o valoare minimă şi se numeşte „eliminare azotoasă minimă" sau „echilibru azotat endogen" sau „*minimum proteinic absolut*", deoarece corespunde metabolismului proteinic

endogen. Dacă se alimentează cu o cantitate de proteine corespunzătoare eliminării minime de azot, eliminarea de azot crește, depășește conținutul în azot al proteinelor date. Deabia după o creștere mai mare a proteinelor date se stabilește un echilibru între N adus (cu proteinele) și N eliminat; acest echilibru se numește *„echilibru minimal al azotului"*. Rubner numește această cantitate „minimul fiziologic al proteinelor". Dacă se mărește progresiv aportul de proteine după realizarea echilibrului azotat minim, bilanțul azotat este la început pozitiv, deci corpul reține cantități mici de proteine, dar după câteva zile se stabilește un nou echilibru în raport cu aportul de proteine. Deci, după ce corpul a atins echilibrul azotat minim se poate stabili un echilibru azotat cu orice cantitate de proteine care depășește acest minim. De exemplu, dacă se dă o cantitate de proteine mai mică decât aceea corespunzătoare echilibrului azotat minim, atunci bilanțul azotat e negativ: corpul elimină mai mult azot decât i se aduce cu proteinele date. După câtva timp însă se stabilește echilibrul dintre N ingerat (proteine) și cel eliminat. Organismul are capacitatea ca, după ce aportul de proteine a depășit echilibrul azotat minim, să realizeze, după o perioadă de latență, un echilibru azotat. Organismul poate să se pună în echilibru — după un interval — cu orice cantitate de proteine. Existența acestei perioade de latență poate fi explicată prin faptul că proteinele nu pot fi depozitate în organism decât în cantități foarte mici.

Mărimea echilibrului minimal depinde de felul alimentației. Dacă necesitatea energetică a organismului e acoperită de glucide echilibrul are valoarea cea mai mică. Dacă se înlocuesc glucidele cu cantități echivalente de grăsimi, atunci echilibrul azotat minim se obține cu cantități mai mari de proteine. Glucidele economisesc deci proteinele în mai mare măsură decât grăsimile. Mărimea valorii echilibrului azotat minim mai depinde și de conținutul în săruri al alimentației; o alimentație lipsită de săruri, săracă în săruri sau chiar una prea bogată, crește cota de uzaj și deci valoarea minimă a echilibrului azotat.

Se vede deci că nivelul cotei de uzaj nu e constant. Datele asupra nivelului eliminării azotate minime variază între 13—26 g. „Echilibrul azotat minim (minimul fiziologic proteinic) este cam de 30—40 g. Problema dacă acest minim fiziologic proteinic e suficient pentru ca organismul să fie capabil de o funcție și de un travaliu normal a fost mult desbătută.

După Rubner, acest minim trebue depășit pentru a da organismului întreaga capacitate de lucru și rezistență. După el există un „minim proteinic practic" sau „igienic" care e cam de 80 g. In genere, albuminele trebue să acopere cam 15% din caloriile necesare.

Valoarea biologică a proteinelor. Mărimea acestui „minim proteinic practic" nu are o valoare fixă; depinde și de natura proteinei. Valoarea biologică a proteinelor variază cu compoziția lor și este importantă determinarea acestei valori nutritive pentru diversele proteine alimentare. Experimental s'a arătat că se pot înlocui proteinele prin produsele lor de degradare, acizii aminați. Se știe că există acizi aminați indispensabili în compoziția alimentelor (acizi aminați pe care organismul nu-i poate sintetiza) și acizi aminați dispensabili din alimentație.

Există acizi aminați necesari creșterii, alții necesari creșterii și menținerii greutății etc. După cum proteinele vor conține acizii aminați care

condiţionează creşterea şi menţinerea greutăţii, cantitatea proteinică minimă practică va fi mai mare sau mai mică.

Valoarea nutritivă a diverselor proteine sau *valoarea lor biologică* este condiţionată de componenţa în aminoacizi, de proporţia de proteine hidrolizate în tractul digestiv.

Se constată în genere, că deoarece proteinele animale conţin proteine mai apropiate de acelea ale omului, ele au cea mai mare valoare biologică. Valoarea biologică a proteinelor din plante e în genere mai mică.

Intr'o alimentaţie compusă din proteine diverse, aşa cum este în genere alimentaţia omului, mai importantă decât valoarea biologică absolută este *valoarea de complectare* a fiecărei proteine: mai multe proteine cu valoare biologică scăzută pot da un amestec care să aibă o valoare biologică complectă. Cantitatea de proteine fixate zilnic trebue să menţină echilibrul azotat la adult şi să corespundă unui bilanţ azotat pozitiv la copii şi femeile însărcinate. Se crede că ar fi necesar: la adult 1 g pe kg, 3,5 g între 1—3 ani, 2,5 g între 5—15 ani, 2 g între 15—17 ani, 1,5 g între 17—20 de ani. In timpul sarcinii se calculează în primele luni 1,5 g/kg, iar ulterior, în timpul alăptării, 2 g/kg.

Studiul valorii nutritive (*valorii biologice*) *a proteinelor* poate fi urmărit prin diverse metode.

Metoda determinării echilibrului azotat. In această metodă, valoarea biologică a proteinei alimentare este dată de procentul de N absorbit şi neeliminat în urină reprezentat de diferenţa dintre N ingerat şi N din fecale (provenit din alimentaţie). De exemplu: un animal alimentat zilnic cu 56,9 mg N excretă în materiile fecale 27,6 mg, din care 5,9 mg provin din alimentaţie; deci animalul absoarbe 56,9—5,9 = 51 mg N. Excreţia zilnică a N urinar este de 48,6 mg, din care 37,7 mg provin din catabolismul tisular (excreţia de N în cazul unei alimentaţii lipsite de N) deci 48,6—37,7 = 10,9 mg N din alimente au fost pierdute în metabolism şi 51,0—10,9 = 40,1 mg au fost reţinute în organism. Valoarea biologică este deci $100 \times \frac{40,1}{51} = 79$.

Metoda stabilirii relaţiei dintre creşterea unui organism tânăr şi ingestia unei cantităţi determinate de proteine, valoarea nutritivă a acesteia din urmă fiind dată de relaţia

$$X = \frac{\text{creşterea în greutate}}{\text{ingestia de proteine}}$$

Măsurarea retenţiei unei proteine ingerate prin dozarea N total al cadavrelor animalelor după hrănirea lor cu proteine.

Organismul îşi poate stabili echilibrul azotat cu cantităţi diferite de proteine şi se pune problema până la ce limită de proteine se poate ajunge fără ca bilanţul azotat să devină negativ. Aceste cantităţi se stabilesc crescând componentele neazotate din alimentaţie şi micşorând pe cele azotate, astfel încât să se menţină la acelaş nivel cantitatea de energie necesară până se ajunge la o proporţie de proteine care nu mai poate fi scăzută fără pierderi proteinice din organism. Se ajunge, deci, la *minimul proteinic* absolut necesar formării substanţelor funcţional importante (hormoni, enzime, etc.), proteinele putând fi înlocuite de glucide şi lipide numai în ceeace priveşte rolul lor energetic.

Scanned with OKEN Scanner

Minimul necesar de glucide

Glucidele constitue un aport necesar în alimentație. S'a constatat că în foame, glucidele sunt în primul rând metabolizate pentru aport energetic, *minimul necesar de glucide* fiind 10—15% din necesitatea energetică totală.

Energia este necesară pentru menținerea funcțiilor respiratorii, musculare, travaliul inimii, etc., și atunci când sunt epuizate glucidele se folosesc lipidele, fapt care e pus în evidență printr'o creștere a lipemiei, deci printr'un transport al grăsimilor de rezervă. In perioada de foame apar corpi cetonici în urină, iar în foamea prelungită întregul metabolism energetic e suportat de lipidele de rezervă și de micile cantități de proteine proprii. In momentul în care eliminarea azotată prin rinichi crește mult, înseamnă că rezerva de glucide și rezerva de lipide au dispărut și necesitatea energetică a organismului este suportată numai de proteinele proprii.

Faptele semnalate mai sus arată importanța stabilirii unui echilibru alimentar just.

Prin administrarea de cantități adecvate sau excesive de glucide, organismul poate economisi proteinele pentru funcțiile lor specifice, altele decât cele energetice, iar în prezența unor mari cantități de grăsimi se economisesc glucidele necesare, la rândul lor, pentru a înlocui proteinele.

Echilibrul alimentar este foarte important. Se admite că este necesar ca omul normal să ingere 100 g proteine, din care jumătate sub formă de proteine animale, 80 g grăsimi, nevoile energetice rămase fiind acoperite de glucide — care sunt necesare și pentru degradarea complectă a acizilor grași —, ceeace corespunde la un minimum de 10—15% din totalul energetic furnizat.

Substanțele anorganice sunt și ele necesare, precum și o serie de *alimente ajutătoare* care, deși nemetabolizate, sunt indispensabile funcționării normale a organismului.

Vedere generală schematică a metabolismului

Fie un adult care se alimentează cu un regim care îi asigură constanța greutății sale — fără pierderi sau beneficiu de materie —, adică intrările compensează exact eliminările, și să presupunem că regimul are constituția următoare: protide 70 g, lipide 80 g, glucide 300 g zilnic.

In medie, protidele, lipidele și glucidele (amidonul) au constituția elementară următoare (vezi tabelul 72).

Tabelul 72

	Carbon (C)	Azot (N)	Sulf (S)
Protide	52%	16%	2%
Lipide	76%	0	0
Glucide	44%	0	0

așa că regimul acesta reprezintă următorul aport:

	C	N	S	Calorii
Protide 70 g.	36 g	11 g	1,4 g	280
Lipide 80 g	61	0	0	720
Glucide 300 g.	132	0	0	1 200
Total	229	11	1,4	2 200

Aceste cantităţi de C, de N şi de S se regăsesc în diversele produse de excreţie ale organismului (aer expirat şi urină, în special). Protidele sunt descompuse în acizii lor aminaţi şi aceştia sunt desaminaţi, conducând la uree. Cele 11 g N protidic corespund la 24 g uree care conţin 5 g C. Cele 229 g C — 5 g = 224 g C se elimină sub formă de CO_2 şi dau 820 g CO_2 sau 420 l din acest gaz care este eliminat prin respiraţie. Urina elimină deci o cantitate foarte mică de C ingerat. Elimină în schimb totalitatea N ingerat (eliminarea urinară zilnică medie este de 20—25 g, corespunzând la 10—12 g azot) şi totalitatea S ingerat (S din proteine, cistină, metionină).

In cursul distrugerii acizilor aminaţi sulfuraţi, S se oxigenează în SO_4H_2, care se regăseşte în urină sub formă de sulfaţi (de potasiu, de sodiu), echivalenţii sulfului protidic ingerat.

Sulfaţii urinari (eliminare urinară zilnică de 1—1,50 g de S) sunt martorii metabolismului protidelor; ei măsoară acest metabolism şi variază în mare măsură cu cantitatea de protide ingerate. Un individ a cărui raţie alimentară este echivalentă din punct de vedere caloric poate — printr'un aport convenabil de lipide şi glucide — să rămână în echilibru azotat şi în perfectă stare de sănătate cu un aport de proteine alimentare de 30 g zilnic, sau aportul poate dimpotrivă să se ridice la 200 g.

In primul caz, azotul ingerat se ridică la numai 4,8 g corespunzător la 10 g uree urinară, şi S ingerat se ridică la 0,60 g şi se regăseşte sub formă de sulfaţi urinari. In al doilea caz, azotul ingerat este de 32 g, corespunzător la 68 g uree urinară, în timp ce S ingerat se ridică la 4 g şi se regăseşte în urină sub formă de sulfaţi. Se vede deci ce variaţii fiziologice largi dau ureea şi sulfaţii urinari.

Necesităţile nutritive

Pentru stabilirea valorii nutritive a alimentelor trebue luaţi în considerare următorii factori: valoarea calorică, proporţiile componentelor de bază, proteine, glucide, lipide, conţinutul în substanţe minerale şi în vitamine.

Valoarea calorică a alimentelor ingerate într'o anumită perioadă trebue să compenseze căldura eliminată în acelaş interval de timp (care corespund metabolismului bazal) şi un surplus corespunzător energiei necesare travaliului.

Calculul necesităţii calorice. Fie un individ având 1,80 m înălţime şi un metabolism de bază de 72 Cal pe oră (1,8 × 40) sau un total de 1 152 Cal în interval de 16 ore când nu doarme. In timpul somnului (8 ore), metabolismul este de 90% din valoarea bazală, adică $\frac{90}{100} \times 72 \times 8 =$ = 518 Cal. In total deci 1 152 + 518 = 1 670 Cal sunt necesare nevoilor energetice zilnice în afară de cele necesare travaliului care, pentru munca uşoară, sunt de 1 200 Cal în medie. Se mai adaugă o proporţie de 6—7% pentru acoperirea acţiunii dinamice specifice a alimentelor astfel că se poate însemna necesitatea calorică totală, în condiţiile de mai sus, astfel:

Metabolismul bazal (corespunzător la 16 ore)	1 152 Cal
Metabolismul bazal din timpul somnului (corespunzător la 8 ore)	518 Cal
Necesitatea energetică pentru o muncă uşoară	1 200 Cal
6% pentru acţiunea dinamică specifică	172 Cal
Total	3 042 Cal

Necesitatea calorică este în funcție de sex și de vârstă.

Femeile au o necesitate nutritivă mai mică; copiii, dimpotrivă, mai mare (metabolism de bază mai mare, energie necesară construirii țesuturilor).

Necesitatea calorică la diverse vârste

E calculată pe baza necesității medie de 3 000 Cal a bărbatului adult (socotită egală cu 1) (vezi tabelul 73).

Tabelul 73

Bărbat	1,00	Copil 8—9½ ani	0,70
Femeie	0,83	„ 6—7½ „	0,60
Băiat peste 14 ani	1,00	„ 3—5½ „	0,50
Fetiță peste 14 ani.	0,88		
Copil 12—13½ ani	0,90	„ 2—2½ „	0,40
„ 10—11½ „	0,80	„ 1—1½ „	0,30
		„ până la 1 an	0,20

Aportul diverselor componente de bază într'o alimentație căreia îi corespund 3 000 Cal este redat în tabelul 74.

Tabelul 74

	Grame	Calorii	Procente din caloriile totale
Glucide	380	1 440	48
Lipide	133	1 200	40
Proteine	90	360	12

Persoanele care fac munci grele, convalescenții, cei care trăiesc în climate dure necesită cantități mai mari de proteine. Grăsimile, deși pot fi sintetizate pe seama glucidelor, sunt indispensabile din alimentație. O serie de acizi grași sunt esențiali — nu pot fi sintetizați în organism —, în special acizii grași nesaturați (linoleic, linolenic, arahidonic). Deficiența acestor acizi grași esențiali — la șobolani — produce necroză caudală, leziuni renale, moarte prematură. În general, absența acestora din alimentație produce leziuni cutanate (eczeme). Grăsimile sunt necesare în cantități mari oamenilor care fac o muncă grea și, în special, în climatul rece. Copiii, în special cei sub un an, necesită o cantitate mai mare de grăsimi.

Substanțele minerale. Necesitatea în săruri este legată de aceea de apă, care este de 2,5 litri zilnic. Necesitatea zilnică în Ca, P, Fe ar fi pentru un adult (70 kg) de: 0,8 g calciu, 1,5 g fosfor, 15—20 mg fier. Necesitatea în calciu a sugarilor este mai mare (2 g pe zi), iar de fier de 0,5 mg pe kg. Fosforul trebue să fie alocat în cantități egale cu calciul copiilor, femeilor însărcinate și în epoca de lactație. O sursă alimentară importantă de calciu este laptele, care conține aproximativ 1,3 g la 250 cc, deasemenea pentru fosfor, dar este sărac în fier. Proteinele sunt o sursă importantă pentru P. Na, K, Mg se aduc prin alimentația vegetală. Sarea (NaCl) se aduce cu alimentația (vezi tabelul 75). Necesitatea în iod este la adult de 0,15—0,30 mg zilnic pentru fiecare kg; la copii 0,002—0,004 miligrame zilnic pe kilocorp. Se obișnuește să se adauge sării (NaCl), preparată pentru alimentație, cantități minime de iod. Alte minerale (Cu, Zn, Co, Fl) sunt necesare în cantități mici. Cuprul 1,0—2,0 mg zilnic, la copii 0,05 mg pe kilocorp.

Vitaminele sunt indispensabile din alimentație.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 75

Conținutul în minerale al diverselor alimente

Alimentul	mg la 100 g aliment proaspăt						
	Fier	Ca	Mg	Na	K	P	Cl
Carne	3,8	8	24	67	35	22	50
Ficat	8,0	11,0	—	—	—	—	—
Ouă	3,0	67	9	15	14	16	100
Lapte	0,2	120	11	51	142	94	120
Făină de grâu	1,1	—	—	—	—	—	—
Făină de ovăs	3,7	93	127	81	380	380	35
Orez decorticat	0,7	8	27	21	68	89	50
Mazăre uscată	5,6	100	145	118	880	397	40
Cartofi	1,2	11	22	19	410	61	30
Spanac	3,8	—	—	—	—	—	—
Mere	0,3	10	8	15	125	13	4
Struguri	3,6	57	9	141	830	126	70

Scanned with OKEN Scanner

Valoarea nutritivă a unor alimente mai importante

Tabelul 76

Alimentul	valori raportate la 100 g					Ca mg	P mg	Fe mg	Vitamina A unit. inter.	Tiamină mg	Riboflavină mg	Niacină mg	Acid ascorbic mg
	Apă %	Calorii	Proteine g	Grăsimi g	Glucide g								
Lapte	90,5	35	3,5	0,1	5,1	118	92	0,07	urme	0,04	0,18	0,1	1
Unt	15,5	733	0,6	81	0,4	16	16	0,2	3 300	urme	0,01	0,1	0
Slănină	0	900	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Margarină	15,5	733	0,6	81	0,4	2	15	0,2	0	0	0	0	0
Ouă	49,4	355	16,3	31,9	0,7	147	586	7,2	3 210	0,3	0,5	—	0
Carne de vacă	68	184	19,7	8	0	11	282	3,0	0	0,18	0,28	6,5	0
Pește	—	—	—	—	—	21	218	1,0	—	0,07	0,07	4,2	2
Carote	88,2	45	1,2	0,3	9,3	39	37	0,8	12 000	0,020	0,6	0,5	6
Cartofi	77,8	85	2,0	0,1	19,1	11	56	0,7	20	0,11	0,04	1,2	17
Ardei verde	92,4	29	1,2	0,2	5,7	11	25	0,4	630	0,07	0,04	0,4	120
Spanac	92,3	25	2,3	0,3	3,2	50	55	3,0	9 420	0,12	0,26	0,7	59
Tomate	94,1	23	1,0	0,3	4,0	11	27	0,6	1 100	0,06	0,04	0,6	23
Mere	84,1	64	0,3	0,4	14,9	6	10	0,3	90	0,04	0,02	0,2	5
Caise	85,4	56	1,0	0,1	12,9	16	23	0,5	2 790	0,03	0,04	0,7	4
Lămâie	86,0	53	0,8	0,1	12,3	14	10	0,1	0	0,04	urme	0,1	45
Portocale	87,2	50	0,9	0,2	11,2	33	23	0,4	190	0,08	0,05	0,9	8
Miere	20,2	319	0,3	0	79,5	5	16	0,9	0	urme	0,04	0,2	4

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 77

Dietă alimentară adecvată

	Calorii cal	Proteine g	Ca g	Fe mg	Vit. A unit. int.	Tiamină mg	Riboflavină mg	Niacină mg	Acid ascorbic mg
Bărbat (70 kg)									
Sedentar	2 500	70	0,8	12	5 000	1,2—1,5	1,6—2,2	12—15	75
Activitate moderată	3 000	70	0,8	12	5 000	1,8	2,2	18	75
Activitate intensă	4 500	70	0,8	12	5 000	2,3	2,6—3,3	23	75
Femeie (56 kg)									
Sedentară	2 100	60	0,8	12	5 000	1,1	1,5—1,8	11—12	70
Activitate moderată	2 500	60	0,8	12	5 000	1,2	1,6	12	70
Activitate intensă	3 000	60	0,8	12	5 000	1,5	2,0	15	70
Sarcină	2 500	85	1,5	15	6 000	1,8	2,5	18	100
Lactaţie	3 000	100	2,0	15	8 000	2,0	3,0	20	150
Copii									
Sub un an	100/kg	3-4/kg	1,0	6	1 500	0,4	4	30	400—800
1— 3 ani	1 200	40	1,0	7	2 000	0,6	6	35	400
4— 6 „	1 600	50	1,0	7	2 000	0,6	6	35	400
7— 9 „	2.000	60	1,0	10	3 500	1,0	10	60	400
10—12 „	2 500	70	1,2	12	4 500	1,2	12	75	400
Fete									
13—15 ani	2 500	70	1,2	12	4 500	1,2	12	75	400
15—20 „	2 400	75	1,0	15	5 000	1,3	13	80	400
Băieţi									
13—15 ani	3 200	85	1,4	15	5 000	1,5	15	80	400
15—20 „	3 800	100	1,4	15	6 000	1,8	18	100	400

Determinarea conţinutului în vitamine al diverselor alimente

Metodele folosite pentru determinarea conţinutului în vitamine al diverselor alimente sunt bazate fie pe testul de prevenire a avitaminozelor (testul preventiv), fie pe testul de vindecare a avitaminozei instalate (testul curativ).

Testele se stabilesc pe animal, folosind în genere şobolanul şi cobaiul, în raport cu sensibilitatea faţă de lipsa vitaminei respective. Se supune animalul unei diete alimentare complecte, dar lipsită de vitamine. In testul de prevenire se adaugă succesiv alimentul care urmează a fi controlat şi se determină cantitatea de vitamină care împiedică apariţia fenomenului de avitaminoză. In testul curativ se notează cantitatea care înlătură fenomenele de avitaminoză. De exemplu, pentru vitamina A se ia un grup de şobolani tineri (21—29 de zile), se menţin la o dietă complectă în proteine, glucide, grăsimi, minerale, vitamine, cu excepţia vitaminei A. Un alt lot de animale este hrănit cu aceeaşi alimentaţie şi în plus cantităţi cunoscute din alimentul care urmează a fi testat în legătură cu conţinutul în această vitamină. După 4 săptămâni apar în primul grup primele simptome de avitaminoză A (simptomele oculare, încetarea creşterii). Se consideră ca *o unitate de vitamină A*, cantitatea de substanţă necesară pentru a preveni acest efect şi a produce o creştere a animalului cu 3 g săptămânal. Aceste unităţi se pot raporta la gramele aliment sau la 100

de calorii. Aceeași metodă se folosește în determinarea celorlalte vitamine. Pentru vitamina B_1 se ia drept criteriu întreruperea creșterii; pentru vitamina C, înlăturarea fenomenelor scorbutice. Pentru vitamina E, restabilirea fertilității la șobolani; pentru vitamina D se folosește testul curativ (controlul la raze X, analiza cenușii oaselor (dieta rahitogenă: porumb măcinat 76%, gluten din secară 20%, ClNa 1%, carbonat de Ca 3%, raportul Ca/P = 4 :1). Pentru vitamina D se poate folosi și metoda colorimetrică cu triclorură de antimoniu și clorură de acetil în cloroform, cu care dă o coloratie roz-galbenă.

Riboflavina este determinată fluorometric (pe baza proprietății fluorescente a vitaminei) sau microbiologic (*lactobacillus casei*).

Acidul nicotinic se determină printr'o metodă care folosește coloratia grupării piridinice cu o amină aromatică în prezența cianurii de brom și prin metoda microbiologică (*B. dysenteric*). *Pyridoxina* se determină printr'o reacție de culoare cu acid sulfanilic diazotat și p. nitroanilină în mediu alcalin, prin metode biologice (pe șobolan), precum și prin metode microbiologice (drojdia de bere, *B. lactis*).

Acidul pantotenic se determină prin testul de creștere a puilor de găină sau prin testul microbiologic (*B. Proteus morgani* sau *lactobacillus casei*); *acidul folic*, prin metode microbiologice (*lactobacillus casei*); *vitamina C* prin metode chimice (puterea reductoare a 2,6-diclorfenolindofenolului), sau testul intradermic de decolorare a aceleiași substanțe (se injectează intradermic o soluție 0,0025 M diclorofenolindofenol); după 10 minute, colorantul este decolorat la animalele suficient alimentate cu vitamină C și după 13 minute la cele cu insuficiență în vitamina C.

Se poate folosi deasemenea determinarea vitaminei C în sânge.

Vitamina K se determină prin metoda curativă; o dietă adecvată în vitamina K corectează la normal timpul de coagulare la puii de găină deficienți în această vitamină.

Tabelul 78

Unitățile internaționale pentru diversele vitamine

Unitatea vitamină A.	Activitatea vitaminică A corespunzătoare la 0,6 micrograme (0,6 γ) caroten pur corespunde la $^1/_4$—$^1/_2$ din cantitatea necesară zilnic pentru a vindeca xeroftalmia și a restabili creșterea la șobolani.
Unitatea vitamină B_1.	Activitatea vitaminică corespunzătoare la 3 g clorură de tiamină.
Unitatea acid pantotenic.	O unitate pui de găină = 14 γ acid pantotenic, corespunde la 1/10 din cantitatea zilnică necesară pentru a stimula creșterea maximă a puiului de găină.
Unitatea de piridoxină.	Cantitatea de vitamină necesară pentru a preveni sau vindeca simptomele avitaminozei corespunzătoare.
Unitatea de riboflavină.	Cantitatea zilnic necesară pentru a produce o creștere normală la șobolani (10 g în greutate pe săptămână).
Unitatea vitaminică C.	Activitatea a 0,05 mg acid ascorbic este 1/10 din cantitatea necesară zilnic pentru a preveni scorbutul la șobolani.
Unitatea vitamină D.	Activitatea caracteristică a 0,025 g vitamină D_2 cristalizată.
Unitatea vitamină E.	Activitatea vitaminei E a 1 mg acetat de α-tocoferol (sintetic) administrat oral previne întreruperea gestației la șobolani în avitaminoză E.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL X

ANTIBIOTICELE

Partea I

ANTAGONIŞTII METABOLICI

Relaţia dintre structura chimică şi acţiunea biologică este unul din factorii cei mai importanţi care trebue luaţi în considerare în studiul mecanismului de acţiune al diverselor substanţe cu rol bacteriostatic sau bactericid. In acest sens, problema antagoniştilor metabolici este una din cele mai interesante.

S'a dat denumirea de *antagonişti metabolici* componentelor chimice având acţiune bacteriostatică sau bactericidă datorită unei analogii structurale cu unele componente funcţionale importante din celula bacteriană.

Orice componentă chimică poate pătrunde în celulă şi dacă are o configuraţie electronică similară unui metabolit esenţial, va putea fi înglobată în punctul specific în care intervine acest metabolit, suferind modificări analoage, dar nu identice, cu acelea pe care le suferă metabolitul normal; ca o consecinţă a acestui fapt are loc o micşorare a vitezei de creştere a celulelor. Se poate însă ca aceste componente să blocheze o enzimă importantă prin combinare cu aceasta şi să ducă astfel la oprirea transformărilor caracteristice metabolitului normal. Componenta normală va funcţiona ca un inhibitor al enzimei şi deci ca un inhibitor al creşterii.

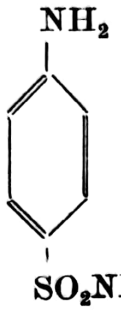
Se presupune că un compus va avea acţiunea antimetabolică cea mai intensă dacă orânduirea lui structurală este cât mai aproape de aceea a metabolitului, diferind printr'un detaliu structural esenţial din moleculă.

Analogia de structură permite înglobarea compusului în celulă sau combinarea şi deci blocarea enzimei specifice, iar diferenţa existentă în anumite detalii de structură înlătură posibilitatea metabolizării normale a acestei componente. Metabolitul analog şi cel normal sunt astfel competitive în raport cu unele puncte funcţionale esenţiale din celulă. Metabolitul analog, având capacitatea de a se substitui celui normal, întrerupe desfăşurarea normală a metabolismului celular.

Un exemplu devenit clasic al acestui tip de acţiune competitivă este acela al *sulfonamidelor*. Aceste componente au acţiune antagonistă cu

acidul paraaminobenzoic, cu care au analogie structurală; diferența rezultă din înlocuirea grupării carboxilice din poziția para printr'un radical sulfonic.

acid paraaminobenzoic (PABA)



sulfanilamida

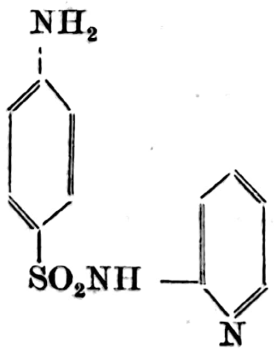
Dintr'o serie de compuși (16) având analogie de structură cu sulfonamidele, numai doi au față de sulfonamide o acțiune antagonistă comparabilă cu aceea a acidului p- aminobenzoic. Aceste componente sunt novocaina și acidul p-hidroxilaminobenzoic care pot fi transformate în același timp în acid paraminobenzoic cu destulă ușurință. Woods, bazat pe aceste fapte, admite că acidul paraaminobenzoic acționează în celulă ca un substrat metabolic foarte important și că sulfonamidele, datorită analogiei de structură, pot să i se substitue competitiv și să turbure astfel metabolismul normal al celulei. Rezistența organismelor la acțiunea sulfonamidelor ar fi datorită capacității acestora de a sintetiza suficient acid paraaminobenzoic pentru a putea anihila acțiunea inhibitorie a sulfonamidelor.

Acțiunea antisulfonamidică a acidului paraaminobenzoic se exercită atât in vivo, cât și in vitro. Șoareci infectați cu cantități letale de *Streptococcus haemoliticus* pot fi apărați prin administrare de sulfamide. Apărarea încetează dacă se administrează simultan acid paraaminobenzoic. Rolul antagonist al acidului paraaminobenzoic față de sulfamide este susținut de faptul că s'a reușit izolarea acestei componente din extractele de levură.

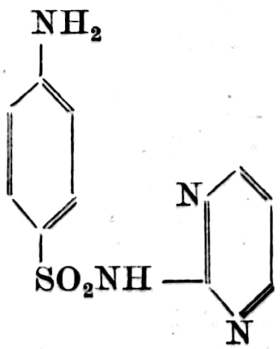
Este deasemenea important faptul că acidul paraaminobenzoic este o componentă a acidului folic, vitamină și factor de creștere atât de important.

Determinări cantitative arată că 23.000 molecule de sulfonamidă inhibă efectul unei molecule de acid paraaminobenzoic, inhibiția molară este deci de 23 000.

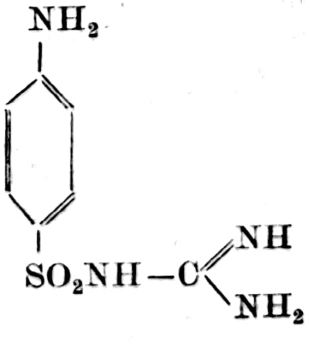
Toate sulfonamidele cu structură similară cu acidul paraaminobenzoic sunt antagonizate de acesta în acțiunea lor asupra organismelor sensibile. Sulfonamidele cel mai mult folosite sunt:



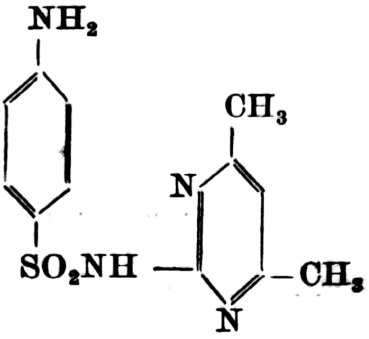
sulfapiridină



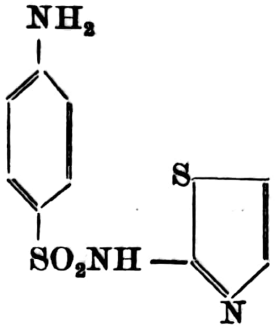
sulfadiazină



sulfaguanidină

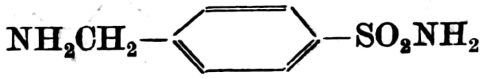


sulfametazină



sulfatiazol

Gruparea esențială este gruparea amină aromatică, având în poziția para o grupare sulfonică sau acidă oarecare. Transformarea grupării sulfonice în grupare amidică inhibă activitatea. Dintre compușii cu structură analoagă având acțiune bacteriostatică, dar neantagonizată de PABA, face parte marfanilul, care nu are însă gruparea aminică aromatică.



marfanil

Inhibarea competitivă se aplică astfel numai la sulfonamidele cu o grupare amină aromatică. Organismele devenite rezistente la una din sulfonamide sunt rezistente la toate sulfonamidele antagonizate de PABA, dar nu și la acelea neantagonizate de acesta. Acțiunea sulfonamidelor este mai repede o acțiune bacteriostatică decât bactericidă.

După unii autori, PABA, antagonistul sulfonamidelor, nu ar fi el însuși un metabolit esențial, ci un *analog chimic* netoxic, care ar deplasa sulfonamidele de pe suprafața unei enzime fără să execute vreo acțiune de inhibare a ei. După alți autori ar inhiba totuși enzimele respiratorii corelate structural, ca de exemplu, coenzimele dehidrogenazelor. Inhibarea respiratorie ar duce la inhibarea reacțiilor producătoare de energie, deci la oprirea diviziunii și creșterii celulare. S'a constatat că inhibarea respirației ar fi proporțională cu inhibarea creșterii. Acidul paraaminobenzoic în concentrații mici (6×10^{-3}—6×10^{-4} M) înlătură acțiunea inhibitoare a sulfonamidelor, dar în concentrații mari (12×10^{-3}— 35×10^{-3}M) este el însuși inhibitor. Acest lucru pledează pentru interpretarea că acidul nu este un metabolit esențial, ci un analog chimic al sulfonamidelor, având afinitate pentru aceeași enzimă; el este mai puțin toxic decât acestea din urmă și deplasează competitiv sulfonamida.

Fapte experimentale arată o interferare a sulfapiridinei cu coenzimele I și II. Deasemenea, sulfonamidele împiedică sinteza acidului folic care, se știe, are o acțiune importantă în hematopoeză; s'a constatat că sulfonamidele în doze mari provoacă leucopenie și granulopenie. Inhibarea creșterii bacteriilor intestinale de către sulfonamide duce la o scădere a vitaminei K și a biotinei sintetizate în organism de aceste bacterii.

Există și alți compuși decât acidul paraaminobenzoic cu acțiune antagonistă față de sulfonamide. Se pot clasifica patru tipuri de acțiuni antagoniste față de sulfonamide.

1. Acțiune antagonistă prin înlăturarea unui metabolit esențial și înlocuirea lui competitivă prin sulfonamide.

2. Stimulare directă a creşterii şi deci o mascare a acţiunii de inhibare prin sulfonamide (de exemplu, glucoza).

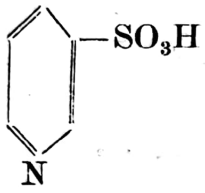
3. Combinare cu sulfonamidele. Prin aceasta se blochează funcţia lor normală de inhibare (de exemplu, proteinele, uretanele).

4. Inhibarea sintezei unor metabolite importante, ca, de exemplu, metionina.

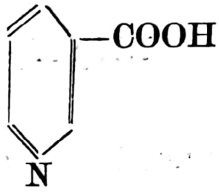
După unii autori, acidul paraaminobenzoic participă la sinteza purinelor, pirimidinelor şi a unei serii de aminoacizi.

Antagonismul acid paraaminobenzoic — sulfonamide a orientat cercetările chemoterapice în sensul găsirii unor analogi metabolici cu acţiune inhibitoare asupra creşterii. Astfel s'au sintetizat compuşi care, ca şi sulfonamidele, să aibă gruparea COOH din moleculă înlocuită cu altă grupare; de exemplu, în acidul nicotinic s'a înlocuit gruparea COOH cu SO_3H şi s'a obţinut:

Acid piridin-3-sulfonic, care se comportă ca inhibitor al creşterii unor microorganisme; acţiunea lui este înlăturată de acidul nicotinic.

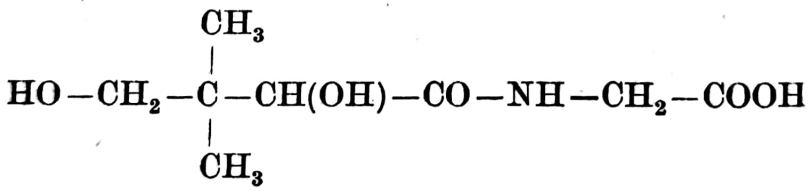


acid piridin-3-sulfonic

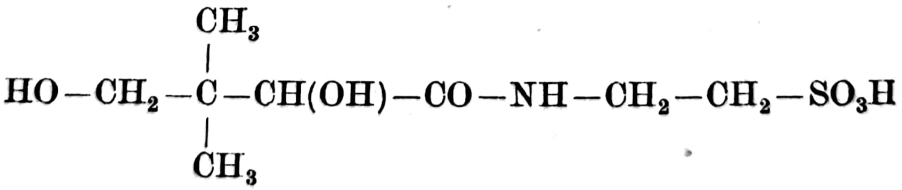


acid nicotinic

Pantoiltaurina — acidul sulfonic derivat din acidul pantotenic — are acţiune bacteriostatică asupra microorganismelor pentru care acesta din urmă constitue un factor de creştere. Taurina antagonizează β-alanina în sinteza moleculei de acid pantonenic.



acid pantotenic



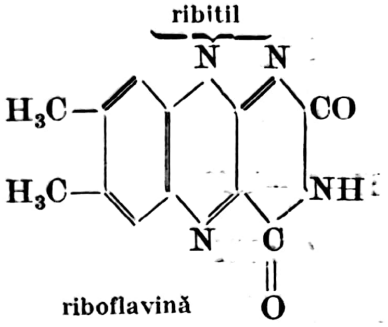
pantoiltaurină

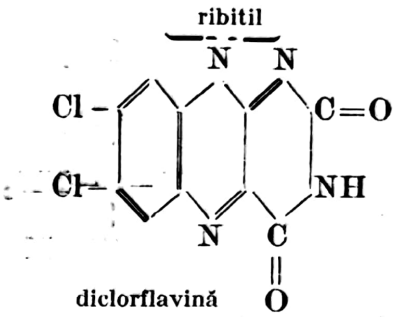
Acţiunea bacteriostatică este competitiv înlăturată de acidul pantotenic. Pantoiltaurina a fost folosită ca agent chemoterapic în infecţiile animale, dar faptul că este repede excretată şi că acidul pantotenic, antagonistul ei natural, există în sânge, îi limitează eficacitatea.

In malaria experimentală s'au folosit cu succes analogii chimici ai acidului pantotenic (probabil că acesta este un factor de creştere a parazitului).

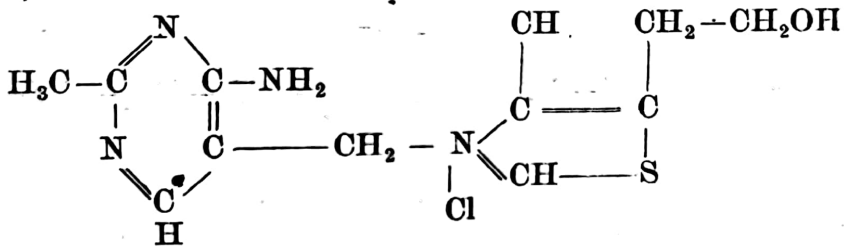
Analogi chimici ai vitaminelor

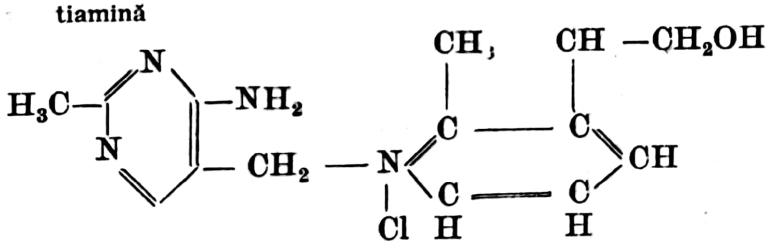
Diverși analogi chimici ai vitaminelor au fost folosiți ca antibiotice. **Diclorflavina** este analogul metabolic al riboflavinei; posedă acțiune de încetinire a creșterii bacteriilor care nu pot sintetiza riboflavina.





Piritiamina, analogul *tiaminei*, are inelul tiazolic înlocuit cu inelul piridinic, inhibă creșterea organismelor care necesită tiamina ca factor de creștere. Microorganismele care pot sintetiza tiamina sunt rezistente acestei acțiuni de inhibare.


tiamină

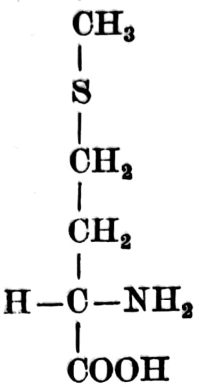

piritiamină

Unele microorganisme pot sintetiza complect molecula tiaminei; altele necesită pentru această sinteză un aport de grupare tiazol sau de grupare pirimidină, iar altele aportul ambelor componente. Acțiunea inhibitoare a piritiaminei va fi înlăturată în raport cu aceste caracteristici, fie prin aport de tiazol, sau de pirimidină, fie prin aportul ambelor componente.

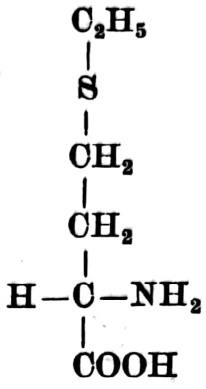
Analogi ai aminoacizilor

Acizii sulfonici ai γ-aminoacizilor antagonizează α-aminoacizii naturali. *Acidul cisteic* este toxic față de anumite microorganisme și acțiunea lui este înlăturată de acidul aspartic, analogul lui chimic. In acidul cisteic, gruparea ω-carboxilică din acidul aspartic este înlocuită de acidul sulfonic. Acidul cisteic inhibă decarboxilarea acidului aspartic cu formare de β-alanină la *B. coli*; acțiunea este antagonizată de acidul pantotenic sau de β-alanină.

Etionina are acțiune toxică asupra *B. coli*, acțiune înlăturată de metionină, analogul ei chimic :



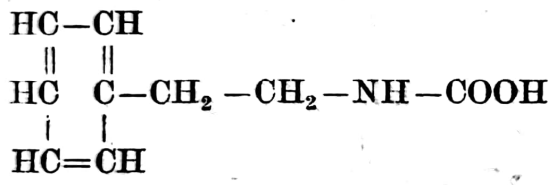
metionină



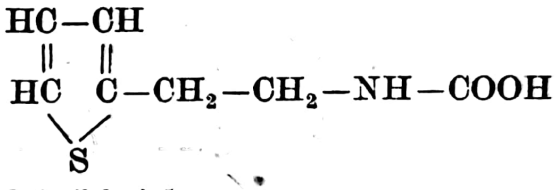
etionină

Deasemenea, analogul metioninei cu oxigen în loc de sulf este inhibitor al creșterii unor microorganisme și este antagonizat de metionină.

Tienilalanina, în care legătura — HC = CH — din molecula fenilalaninei e înlocuită cu — S — cu acțiune inhibitoare asupra unor ciuperci și bacterii, este antagonizată de fenilalanină, analogul ei chimic :



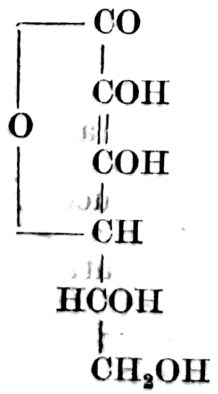
fenilalanină



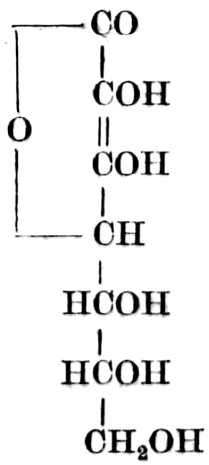
2-tienilalanină

Formele *d* și *l* ale aminoacizilor sunt analogi competitivi în anumite cazuri. Acțiunea competitivă a analogilor chimici se exercită în general în raport cu anumite grupări active ale enzimei care intervine în metabolismul componentei normale. Analogul metabolic înlătură sau micșorează posibilitatea de metabolizare a metabolitului normal, metabolizare care este esențială pentru celulă. Analogii metabolici pot provoca la animale anumite simptome care să fie înlăturate de metabolitul analog normal ; astfel :

Acidul glucoascorbic, un compus sintetic, poate provoca la animalele alimentate cu această componentă o stare analoagă scorbutului, care este înlăturată prin aport de acid ascorbic în exces :

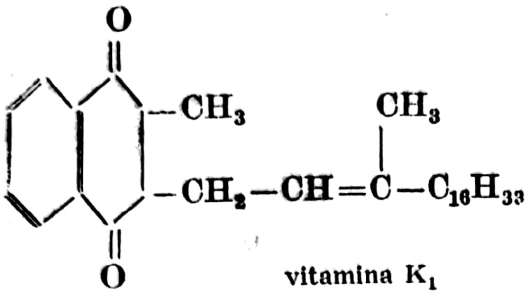


acid ascorbic

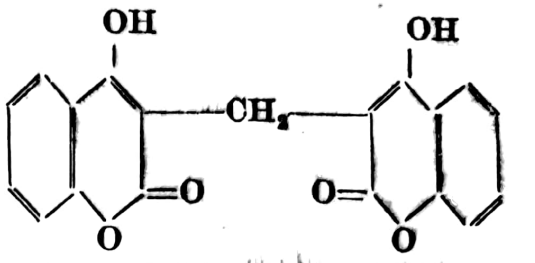


acid glucoascorbic

Dicumarolul (3,3′-metilen bis-4 hidroxicumarina) produce la animale simptomele caracteristice avitaminozei K (creșterea timpului de coagulare sanguină). Aportul de vitamină K, analogul său chimic, înlătură simptomele :

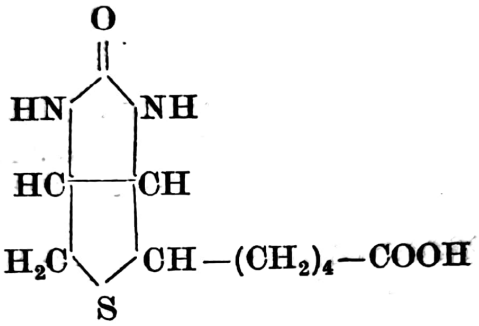


vitamina K_1

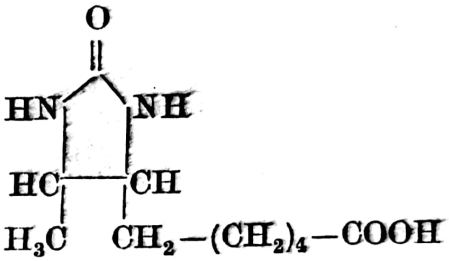


dicumarol (3,3′ metilen bis — 4 hidroxicumarină)

Analogi metabolici sunt deasemenea *biotina* și *destiobiotina*. Biotina și destiobiotina sunt analogi competitivi în creșterea unor bacterii și microorganisme :



biotină



destiobiotină

Un caz tipic de inhibare specifică datorită competiției pentru gruparea activă între inhibitor și substrat sau coenzimă este acela al succinodehidrogenazei. Acidul malonic $H_2C(COOH)_2$, omologul inferior al acidului succinic $H_2C(CH_2COOH)_2$, inhibă succinodehidrogenaza, oprind accesul acidului succinic la enzima corespunzătoare. Aceasta se poate demonstra prin creșterea raportului acid succinic/acid malonic în sistem. Intensitatea de inhibare crește pe măsură ce se adaugă acid succinic și se deplasează acidul malonic combinat cu enzimă. Inhibarea este reversibilă și poate fi complect înlăturată cu exces de acid succinic. Pentru o anumită concentrație de enzimă inhibarea este în funcție de concentrația inhibitorului și a substratului.

Acest lucru este o caracteristică a inhibării competitive și este folosit drept criteriu de identificare a acestui tip de inhibare, atât in *vitro*, cât și in vivo.

Alte substrate analoage chimic cu acidul succinic, ca de exemplu: au acțiune de inhibare a succinodehidrogenazei. Unele diamine cu catenă lungă inhibă diaminooxidaza.

$$COOH-CH_2-CH_2-CH_2-COOH$$

$$C_6H_5-CH_2-CH_2-COOH$$

$$COOH-CH_2-C_2H_5-COOH$$

$$C_6H_5-CH_2-COOH$$

$$COOH-CH_2-\underset{\displaystyle COOH}{\underset{|}{CH}}-CH_2-COOH$$

$$C_6H_5-CH\ (OH)-COOH$$

Inhibarea este desemnată ca necompetitivă când gradul de inhibare nu este corelat cu concentrația substratului, ci numai cu aceea a inhibitorului. In acest caz, inhibitorul se combină cu o grupare esențială activării substratului, dar care nu se combină ea însăși cu substratul. Această inhibare necompetitivă poate fi înlăturată de analogi ai substratului, ca de exemplu inhibarea arginazei de către aminoacizi. Când inhibarea unei enzime de către diferiți inhibitori are loc competitiv și necompetitiv, analogii care produc inhibarea competitivă sunt mai asemănători substratului decât analogii care produc inhibarea necompetitivă. Acesta este cazul *arginazei*, care face scindarea argininei în ornitină și uree. Diaminoacidul lizina inhibă acțiunea arginazei prin acțiunea competitivă, gradul de inhibare fiind dependent, pentru o anumită concentrație a enzimei, de raportul inhibitor arginină.

Monoaminoacizii, pe de altă parte, au asupra aceleiași enzime o acțiune inhibitoare necompetitivă, în care concentrația substratului nu are un efect marcat asupra gradului de inhibare. Ornitina, unul din produsele din reacție, are acțiune inhibitoare competitivă.

Un inhibitor poate fi clasat ca inhibitor competitiv pentru o anumită enzimă și necompetitiv pentru altă enzimă.

Partea II

CHIMIA ANTIBIOTICELOR

Antibioticele sunt substanțe antibacteriene produse de microorganisme în timpul creșterii lor în medii de cultură adecvate.

Un antibiotic este definit ca produsul activității metabolice a unei specii de microorganisme, produs cu acțiune inhibitoare asupra creșterii altei specii de microorganisme. Această definiție exclude din clasa antibioticelor naturale sulfonamidele, deși acțiunea lor este analoagă.

Se știe de mai multă vreme că prezența unei anumite specii microbiene poate inhiba creșterea altor microorganisme. Pasteur și Joubert (1877) au pus în evidență efectul antagonist al bacteriilor anaerobe asupra creșterii *B. anthracis* și Babeș, în 1885, atribuia, primul, acțiunea de inhibare a unui organism de către alt organism unei substanțe chimice produsă de acesta din urmă. In 1889 s'a preparat un extract din *Pseudomonas pyocyanea* (*Bacillus pyocyaneus*) cu acțiune inhibitoare asupra creșterii multor bacterii, căruia i s'a dat numele de piocianază; acțiunea de inhibare este un atribut al pigmentului piocianina, produs de acest microorganism și nu al vreunei enzime, cum se credea inițial. S'a izolat (1907, Nicolle) din *Baccillus subtilis* o substanță termostabilă cu acțiune litică asupra multor microorganisme.

Scanned with OKEN Scanner

S'au găsit, ulterior, o serie întreagă de fungi producătoare de substanțe cu acțiune antibacteriană.

In 1929, Fleming înregistrează un fapt extrem de important. Intr'un mediu de cultură însămânțat cu *Staphilococcus aureus* și contaminat cu o ciupercă, germenul devine transparent, e lizat și creșterea este oprită. Ciuperca a fost identificată ca aparținând speciei *Penicillium notatum*. El mai constată că mediul în care este cultivată această ciupercă are proprietăți bacteriolitice și bactericide față de o serie de germeni Gram + (stafilococ, streptococ, b. difteric) dar este inactiv față de germenii Gram negativi. (*Escherichia coli*, *Eberthella typhosa*, *Haemophillus influenzae*). Fleming numește substanța activă din mediu, penicilină; nefiind toxică pentru om, și pentru animale, el sugerează folosirea ei în terapeutica bolilor infecțioase provocate de germeni sensibili la acțiunea penicilinei. Savanții sovietici Borodulina (1935), Nahimovscaia (1937), Crassilnicov și Cirenco atrag atenția asupra substanțelor antibiotice produse de ciuperci și asupra antagonismului dintre actinomicete și bacterii.

Aplicarea în clinică a antibioticelor începe însă în 1939, când Dubos obține dintr'un microorganism izolat din pământ, *Bacillus brevis*, două substanțe antibacteriene: *gramicidina și tirocidina*. Aceste substanțe au fost izolate din extractele alcoolice și cristalizate.

In 1944, cercetătorii sovietici Belozerschi și Pașina izolează antibioticul gramicidina S, și tot în 1944, Waksmann și colaboratorii extrag dintr'un actinomicet o substanță cu acțiune asupra lui *Mycobacterium tuberculosis* și asupra germenilor Gram negativi. Studiul antibioticelor, căutarea altora noi și lămurirea mecanismului lor de acțiune reprezintă un domeniu încă în plin fază de cercetare.

Clasificarea antibioticelor se poate face după criteriul originii acestora și după criteriul structurii lor chimice.

Conform criteriului chimic de clasificare, ele se pot împărți în:

1. antibiotice cu structură aciclică,
2. antibiotice cu structură aromatică,
3. antibiotice cu structură chinonică,
4. antibiotice derivate de furan și piran,
5. antibiotice cu structură polipeptidică,
6. antibiotice cu structură heterociclică, conținând azot,
7. antibiotice cu formula brută stabilită.
8. antibiotice cu structura nedeterminată.

Vom aminti pe cele mai importante dintre antibioticele aparținând acestor clase.

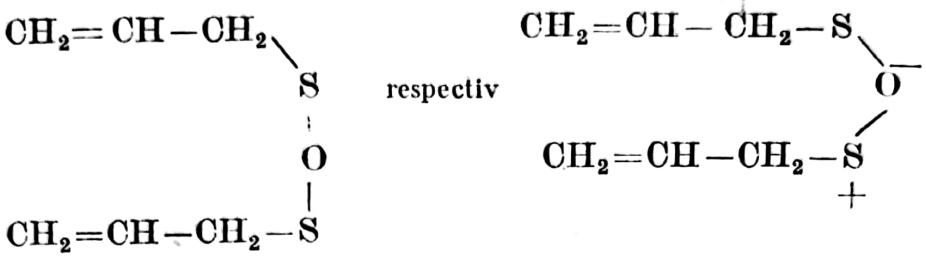
Alicina a fost extrasă din usturoi (dintr'un kg usturoi se obțin 1,5 g alicină). Este un antibiotic cu structură aciclică, care a fost obținut în formă purificată. Este activ în concentrație de 1/225 000 față de germeni Gram + și unii Gram —. Este însă foarte toxic. Alicina face parte din grupa antibioticelor produse de plantele superioare, din grupa fitoncidelor.

Scanned with OKEN Scanner

Fitoncidele

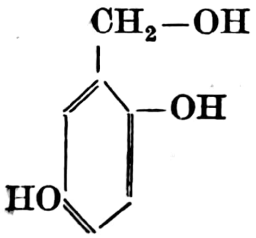
Fitoncidele sunt emanaţii volatile care apar în cursul proceselor vitale ale plantelor şi constitue unul din mijloacele de apărare ale acestora. Ceapa şi usturoiul posedă cea mai puternică acţiune de acest fel :

Alicina are formula :

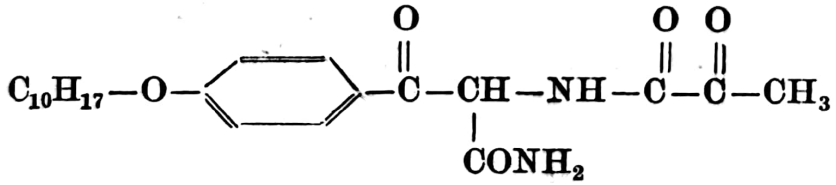


Efectul antibiotic al alicinei ar fi datorit acţiunii ei asupra enzimelor celulare, prin interferarea cu grupările cisteinice.

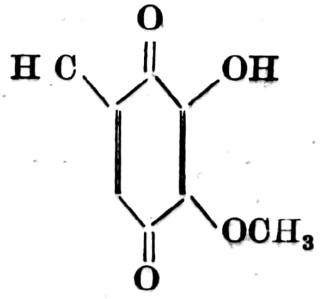
Acidul gentizilic, alcool 2—5 dioxibenzilic, antibiotic cu structură aromatică, este produs de *Penicillium patulum*. Nu are acţiune antibiotică specifică.



Micelinamida se formează în mucegaiul *Penicillium grixofulvum* :



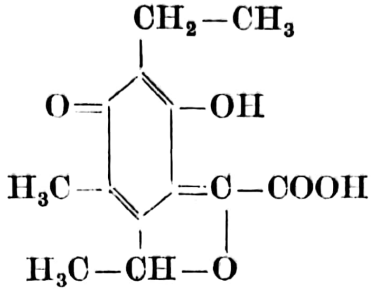
Fumigatina este produsă de *Aspergillus fumigatus* şi aparţine grupei de antibiotice cu structură chinonică. Introducerea grupării metoxi măreşte activitatea antibiotică; gruparea OH o scade, iar înlocuirea grupării O—CH$_3$ cu OH reduce mult activitatea antibiotică.



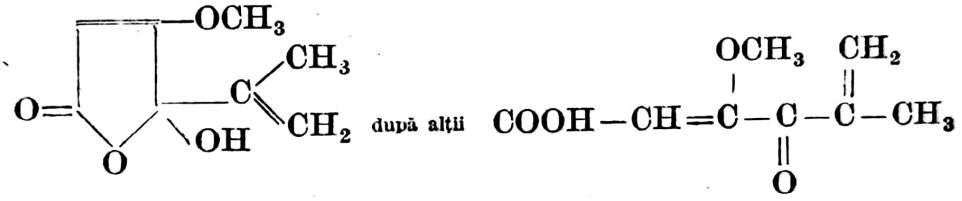
Se cunosc o serie de derivaţi chinonici cu activitate antibiotică.

Plumbagina, 3-metil-5-oxi-1,4-naftochinona, are acţiune asupra unor ciuperci patogene pentru om.

Citrinina are structură chinonică, este bacteriostatică față de o serie de bacterii, dar este toxică, astfel că poate fi folosită numai în infecții locale :

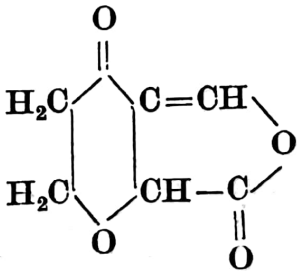


Acidul penicilic se obține din filtratele culturilor de *Penicillium phaseolum*; inhibă creșterea microorganismelor Gram + și Gram − . Este însă toxic. Este un derivat al furanului și are formula :



după alții

Clavacina are formula brută $C_7H_6O_4$, este extrasă din diverse organisme; din *Aspergillus clavatus* se extrate substanța cu numele de *clavacină*; substanța extrasă din *Penicillium patulum* are numele de *patulină*, iar din *Penicillium claviforma* se extrage *claviformina*. Inhibă creșterea unei serii de microorganisme Gram + și Gram − :



clavacina

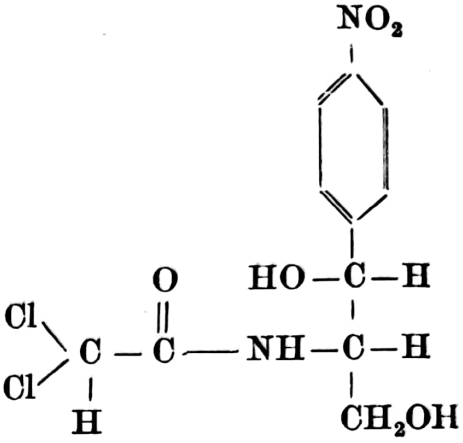
Cloromicetina este, alături de penicilină și de streptomicină, unul din antibioticele cele mai active. Cloromicetina sau cloramfenicolul este numele comercial al produsului izolat din actinomicetul *Streptomyces venezuelae*. Are formula brută $C_{11}H_{12}O_5N_2Cl_2$. S'a reușit sinteza acestei substanțe. Este optic activă. Studiul spectrului de absorbție în ultraviolet indică o grupare nitro legată direct de nucleul benzenic; este astfel singurul compus natural cunoscut având o grupare nitro. Clorul este neionizabil, dar nu este legat în nucleu. Cloromicetina este 1-p-nitrofenol, 2-dicloracetamidă, 1, 3-propandiol.

Conține 2 carboni asimetrici, dintre care numai unul are acțiune antibiotică.

S'a reușit sinteza cloromicetinei plecând dela p-nitrotoluen. Descoperirea cloramfenicolului este un fapt extrem de important în terapeutica bolilor infecțioase, deoarece acest antibiotic are acțiune asupra unor germeni din grupa coli și tific, asupra cărora penicilina nu are nico acțiune, și anume asupra *B. escherichia coli* și *B. typhosum.*

Este un antibiotic foarte eficace în tratamentul febrei tifoide.

Acțiunea bacteriostatică și bactericidă a cloromicetinei asupra acestor germeni este atribuită împiedicării sintezei și degradării triptofanului, componentă indispensabilă creșterii acestor germeni. Cloromicetina are acțiune și asupra altor germeni, având un spectru bacteriostatic destul de larg.



cloramfenicol
(1 – p – nitrofenol – 2 – dicloracxetamida – 1,3 – propandiol)

PENICILINELE

Faptul observat de Fleming (1929), că o cultură de *Staphylococcus aureus* contaminată cu *Penicillium notatum* este inhibată în creșterea ei, constitue punctul de plecare al unei noi epoci în terapeutica bolilor infecțioase, epoca substanțelor antibiotice. El studiază acțiunea filtratelor culturilor acestei ciuperci și activitatea lor bacteriolitică și bactericidă asupra unei întregi serii de germeni și folosește acest filtrat concentrat, căruia îi dă numele de penicilină, pentru separarea diferențială a germenilor în raport cu rezistența lor față de acțiunea acestuia.

In 1940—1941, Chain, Florey și colaboratorii izolează din mediul de cultură a ciupercii *Penicillium notatum* o pulbere solubilă în apă cu activitate antibacteriană remarcabilă. Acest preparat, administrat in vivo subcutanat, nu este toxic pentru animal și produce vindecarea șoarecilor infectați cu *Streptococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium septicum* în 100% din cazuri. In momentul de față, penicilinele se prepară pe scară comercială în cele mai multe țări și este antibioticul cel mai larg utilizat dintre toate antibioticele cunoscute până acum.

PROPRIETĂȚILE CHIMICE ALE PENICILINELOR

Penicilinele sunt acizi organici monobazici, puternici, cu pH=2,9 (aciditatea e datorită grupării — COOH —); formează săruri cu metalele alcaline Na, K, cu bazele organice ca procaina, formează esteri (ca esterul benzilic, de exemplu). Sunt solubile în apă și solvenți organici (eter, cloroform). Sunt extrem de instabile în soluții apoase sub formă de acizi liberi, sunt ceva mai stabile sub formă de săruri, în soluții acide și alcaline sunt rapid inactivate. Zona de mai mare stabilitate este cuprinsă între pH 5—8.

Penicilinele în soluţie sunt inactivate de o serie de factori: ionii metalelor grele, inclusiv Zn şi Cd, alcooli, baze, pH-uri acide sau alcaline, agenţi oxidanţi, căldură şi sub acţiunea unei enzime specifice elaborată de unii germeni, penicilinaza.

Din cauza marii sensibilităţi faţă de diverşi agenţi chimici, purificarea penicilinelor şi obţinerea lor pe cale comercială constitue o problemă foarte complicată.

Prima penicilină obţinută sub formă pură şi în acelaş timp şi prima penicilină obţinută sintetic a fost penicilina G (benzilpenicilina) (1943).

Până acum s'au obţinut sub formă cristalizată numai penicilinele metalelor alcaline, respectiv sarea de sodiu a penicilinei G, cristalizată, produsă pe cale industrială şi constituind forma comercială cea mai utilizată. Penicilinele se păstrează sub formă cristalizată, uscată, deoarece soluţia lor se inactivează cu foarte mare uşurinţă. Produsul cristalizat e mai stabil decât cel amorf. Preparatele uleioase ale penicilinelor cristalizate sunt însă stabile şi se pot deci păstra un timp mai îndelungat.

Cristalele sărurilor de sodiu ale penicilinei se prezintă sub formă de arce incolore, puternic dextrogire: *benzilpenicilina* (penicilina G) şi *Δ-pentenil-penicilina* (penicilina F) au o activitate optică de + 305°.

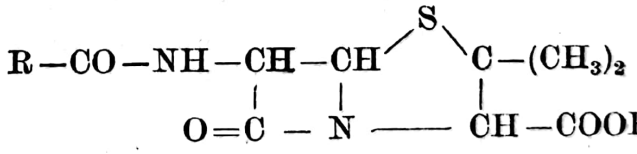
STRUCTURA CHIMICĂ A PENICILINELOR

Studiul chimic al penicilinei a fost urmărit în mai multe laboratoare şi a necesitat eforturi de lungă durată şi lucrări de mare precizie. Acest studiu a stabilit că există câteva peniciline cu proprietăţi biologice şi chimice foarte apropiate, dar deosebite între ele prin anumite detalii de structură chimică. Cercetările au indicat că *toate penicilinele conţin un nucleu comun şi se deosebesc între ele prin structura catenei laterale.* Au fost notate cu numerele I, II, III şi IV, sau respectiv cu literele F, G, X şi K. Penicilinele au toate formula generală:

$R-CO-NH-C_9H_9-O-S-N-COOH$, unde R este diferit.

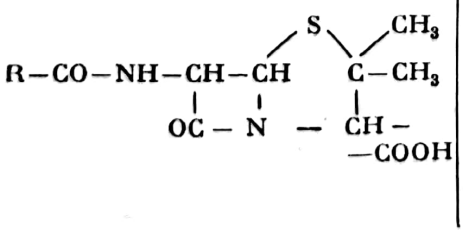
Nucleul comun este un heterociclu β-lactam, la care este fixat radicalul R, diferit pentru diversele peniciline. Prezenţa unui heterociclu β-lactamic tetraatomic a fost confirmată prin studiul röntgenogramelor.

Formula este astfel:



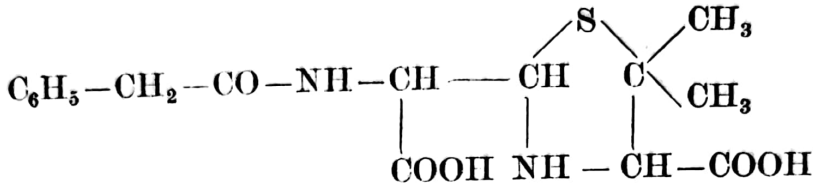
In tabelul alăturat este redată structura chimică a radicalului R al diverselor peniciline (vezi tabelul 79).

Tabelul 79

	R	Denumirea penicilinei
	$-CH_2-CH=CH-CH_2-CH_3$ (Δ^2-pentenil)	F (I)
	$-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$ (n-amil)	Dihidro (F)
	$-CH_2C_6H_5$ (benzil)	G (II)
	(p-hidroxilbenzil)	X (III)
	$-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$ (n-heptil)	K (IV)

Penicilinele sunt acizi monobazici, dar compușii lor de descompunere în soluții apoase, soluții alcaline sau metanol, sunt acizi bibazici. Această descompunere are loc cu extremă ușurință și chiar la temperatura camerei și arată că în molecula penicilinei trebue să existe o a doua grupare carboxilică, legată. Compusul acid format astfel s'a dovedit a fi un acid bibazic :

acidul peniciloic, compus inactiv, având două grupări carboxilice libere. Dacă se ia în considerare penicilina G, formula acidului peniciloic este :

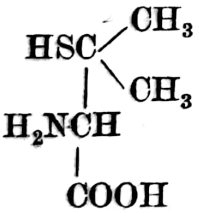


G-acidul peniciloic

Tratarea acidului peniciloic cu acizi, la cald, duce la eliberarea CO_2 din gruparea COOH și formarea a doi compuși : unul cu caracter aminoacid numit *penicilamina*, și celălalt cu caracter acid, *G-acidul penaldic.*

Penicilamina

Hidrolizatul acid al penicilinei dă și el o reacție puternic pozitivă cu ninhidrina, ceeace confirmă prezența unui α-aminoacid, în moleculă ; a fost primul compus de descompunere a penicilinei separat sub formă cristalizată. Analiza lui indică prezența sulfului în moleculă (reacție intensă cu nitroprusiatul de sodiu). Aminoacidul acesta conținând sulf în moleculă este *penicilamina* și are formula următoare, confirmată și prin sinteză :



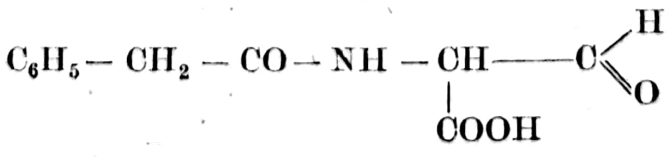
penicilamină

Penicilamina ar fi astfel d-β-dimetilcisteina. Penicilamina naturală se comportă ca forma *d* nenaturală, are configurație *d* în jurul carbonului α, fapt confirmat prin determinări optice. Prin eliminarea sulfului din moleculă se obține *d*-valina. Penicilamina se prezintă astfel ca un *d*-aminoacid, care nu a fost încă întâlnit în nicio substanță biologică. Formele *d* au fost întâlnite ulterior în alte componente cu activitate antibiotică, gramicidina și tirocidina, și în capsula *B. anthracis*. Penicilamina are unele analogii chimice cu cisteina, dar și unele deosebiri.

Penicilamina este componenta comună tuturor penicilinelor.

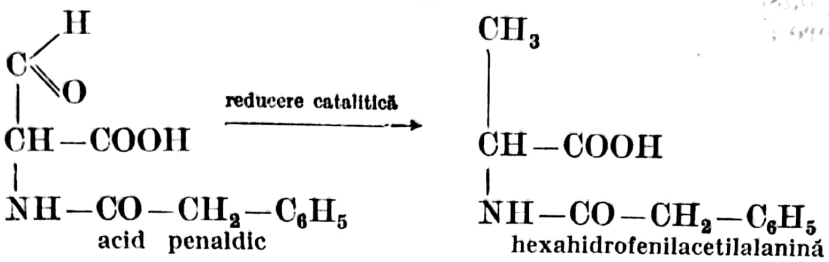
Acidul penaldic

A doua componentă rezultată din acid G-peniciloic, respectiv din G-penicilina, prin degradarea acesteia sub acțiunea $HgCl_2$, este acidul penaldic sau penaldioic ; este un aldehidoacid cu următoarea structură :



acid penaldic

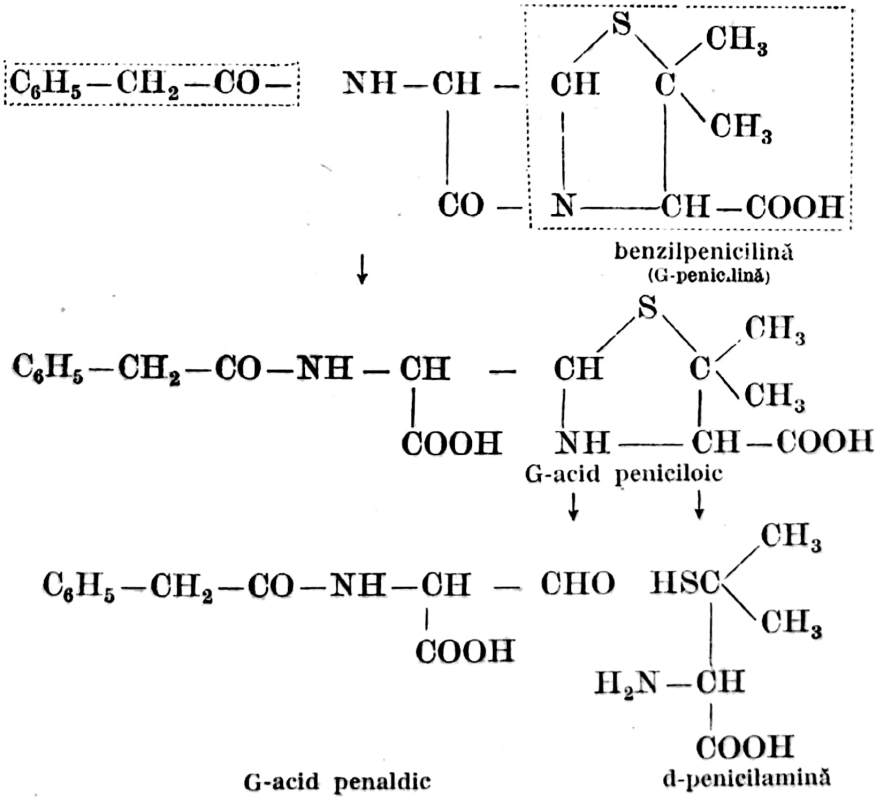
Structura acestui aldehidoacid a fost dovedită prin reducerea lui catalitică la hexahidrofenilacetilalanină.



Rezumând toate lucrările laborioase referitoare la structura penicilinelor, confirmate şi prin cercetările röntgenografice ale acestor structuri, se admite pentru peniciline un nucleu β-lactamic comun, un heterociclu tetracarbonic şi o catenă laterală, caracteristică diverselor peniciline.

S'a stabilit că molecula penicilinei constă din trei părţi : 1) tioaminacidul (penicilamina); 2) o grupare carboxilică labilă care eliberează cu uşurinţă CO_2 prin încălzirea la 60° a penicilinei libere sau prin tratarea penicilinei în soluţii alcaline cu $HgCl_2$ şi 3) aldehida peniloică. Primele două componente, adică penicilamina şi grupa labilă carboxilică, sunt comune tuturor penicilinelor. Peniciloaldehida diferă astfel : în penicilina G este aldehida fenilacetică, aldehidacidul penaldic, aldehida p-oxifenilacetilaminoacetică în penicilina X, aldehida n-heptoilaminoacetică în penicilina K, aldehida hexenoilaminoacetică în penicilina F. Penicilamina şi aldehida peniloică sunt legate într'un ciclu tiazolidinic, iar formarea acidului peniciloic sub formă de sare cristalizată în urma inactivării apoase sau metanolice a penicilinei arată că a doua grupare CO este legată labil.

Astfel, penicilina G (benzilpenicilina) are formula :



Structura penicilinei dedusă din analiza produselor naturale a fost confirmată prin sinteză, produsul sintetizat fiind identic în ceeace privește proprietățile fizice, chimice și biologice cu penicilina naturală.

Penicilina ar avea, în ultimă analiză, structura unui dipeptid format din doi aminoacizi β-tiovalina (β-dimetilcisteina) și serina acilată, a cărei grupare alcoolică a fost oxidată în grupare aldehidică. Legătura peptidică dintrei ei are un caracter cu totul special și neîntâlnit încă la alte produse naturale : formează ciclul β-*lactamic*.

Această legătură imprimă penicilinei proprietățile biologice și chimice specifice.

Acest fapt este foarte important, deoarece arată că un compus foarte simplu ca atare, un dipeptid, poate dobândi proprietăți chimice și biologice specifice datorită unui nou tip de legătură între cei doi aminoacizi.

Farmacologia penicilinei.

Penicilina are acțiune bacteriostatică și bactericidă față de aproape toți germenii Gram pozitivi și față de spirochete. Are acțiune extrem de slabă sau deloc față de germenii Gram negativi. Este extrem de activă, este bacteriostatică în diluții care depășesc 1×10^{-8}.

Benzilpenicilina este cea mai eficace. Penicilina nu este toxică pentru țesuturile animale decât în doze extrem de mari, care depășesc dozele terapeutice. Poate produce însă reacții alergice. Preparatul aliltiometilpenicilina ar fi mai puțin toxic și sensibilizant. Activitatea lui nu este influențată de proteinele tisulare, de produsele metabolice, de numărul bacteriilor. Din acest punct de vedere este un agent chimioterapic ideal.

Administrarea penicilinei întâmpină însă o serie de dificultăți și anume :

1. Nu poate fi administrată pe cale orală, deoarece este repede distrusă de aciditatea stomacală. (Pacienții suferind de aclorhidrie absorb mult mai bine penicilina). Prezența penicilinazei, enzimă care distruge penicilina și care poate fi elaborată de bacteriile intestinale (*B. coli*, de exemplu) limitează deasemenea administrarea acesteia pe cale orală. Trebue administrată numai pe cale subcutanată sau intravenoasă.

2. Este rapid excretată în urină, ceeace necesită administrarea ei în doze mari și frecvente.

Penicilina administrată parenteral se distribue rapid prin lichidele extracelulare și este concentrată în unele organe, în special în ficat și rinichi. Administrată subcutanat se distribue mai lent decât atunci când este administrată intravenos. Administrată intravenos, concentrația ei în plasmă scade brusc chiar după 15 minute. Rapiditatea excreției renale a penicilinei este unul din marile desavantaje ale acestui antibiotic, astfel că au fost făcute o serie de încercări de a reduce această eliminare. Administrarea simultană cu caronamida (4-carboxifenilmetansulfonanilida) reduce mult excreția urinară (excreția tubulară a penicilinei), astfel încât concentrația ei în plasmă după o singură injecție este de 2—7 ori mai mare.

Peniciilina difuzează greu prin bariera hematoencefalică. Este transmisă prin bariera placentară dela mamă la făt și este secretată în cantități mici în lapte.

Penicilina se determină în general, ca toate antibioticele, punând în evidență acțiunea ei inhibitoare asupra unor microorganisme. Metodele

microbiologice sunt cele folosite în general și sunt bazate pe determinarea acțiunii de inhibare a soluțiilor controlate. Ca microorganism test se utilizează *Staphylococcus aureus* și *Streptococcus haemolyticus*.

Unitatea de penicilină este egală cu 0,6 γ-Na G-penicilină.

Mecanismul de acțiune al penicilinei

Acțiunea antibiotică a penicilinei se exercită în special asupra bacteriilor Gram pozitive, această acțiune fiind atât bacteriostatică, cât și bactericidă, și se manifestă din punctul de vedere al modificărilor metabolice sub multiple aspecte.

1. **Modifică respirația germenilor.** Respirația germenilor supuși acțiunii penicilinei este stimulată de micile concentrații și inhibată de concentrațiile mai mari de antibiotic. In experiențele asupra stafilococului se constată o perioadă de latență și o perioadă inhibitoare activă. De exemplu, la 0,05—0,1 unități pe cc, după o lungă perioadă de latență survine o rapidă descreștere a respirației care întovărășește desintegrarea cocilor. La 1—1 000 unități pe cc respirația încetează după o perioadă de latență mai scurtă; fenomenul corespunde efectului bacteriostatic.

2. **Modifică potențialul de oxidoreducere** al mediilor de cultură ale germenilor supuși acțiunii ei. Sub acțiunea penicilinei s'a constatat o creștere a potențialului de oxidoreducere în mediile de cultură ale germenilor penicilinosensibili.

3. **Modifică metabolismul acizilor nucleici.** Penicilina inhibă ribonucleaza, fapt care ar atrage o turburare a metabolismului acidului ribonucleic în sensul unei acumulări precoce a acestei componente.

4. **Modifică asimilarea unor aminoacizi indispensabili.** Penicilina blochează asimilarea acidului glutamic. Acest fapt este extrem de interesant, deoarece este corelat cu însuși caracterul de selectivitate al penicilinei față de germenii Gram pozitivi și Gram negativi și cu caracterul de rezistență la penicilină.

Se știe că penicilina are o remarcabilă selectivitate antibiotică în raport cu germenii Gram pozitivi și Gram negativi.

Concentrații extrem de mici inhibă microorganismele Gram pozitive, pe când concentrații chiar foarte mari nu au niciun efect sau unul foarte redus asupra organismelor Gram negative. Această acțiune selectivă ar sugera că penicilina inhibă o reacție biochimică esențială pentru prima grupă de microorganisme, dar neesențială pentru a doua grupă.

S'a constatat că organismele Gram negative pot sintetiza aminoacizii necesari, pe când cele Gram pozitive depind în mare măsură de aportul exterior, de prezența acestora în mediul de cultură.

Procesul de transport al acidului glutamic prin peretele celular este un proces endergonic; el nu există la germenii Gram negativi. Existența acestui mecanism biochimic endergonic a sugerat că antibioticul care acționează ca inhibitor selectiv asupra germenilor Gram pozitivi ar inhiba acest mecanism caracteristic.

S'a găsit într'adevăr că penicilina inhiba fixarea acidului glutamic de către *Staphylococcus aureus* fixarea de acid glutamic și viabilitatea germenului mergând paralel. Studiul rezistenței la penicilină susține acest punct de vedere. S'a constatat astfel că un organism de 10 ori mai rezistent decât altul necesită de 10 ori mai multă penicilină pentru ca asimilarea

acidului glutamic să fie oprită. *Staphylococcus aureus*, antrenat la concentrații variabile de penicilină prin subculturi seriate în concentrații crescânde de antibiotic, pierde afinitatea pentru acidul glutamic din mediu și își modifică metabolismul în sensul unei capacități de a sintetiza acest aminoacid; paralel cu această modificare metabolică, germenii devin Gram negativi. Problema dacă această modificare este o cauză sau un efect al rezistenței câștigate este încă nelămurită. Toate aceste acțiuni pot fi corelate cu pierderea viabilității germenului.

Trebue amintit aici că unul din mecanismele de apărare ale unor germeni Gram negativi este capacitatea acestora de a fabrica enzime, penicilinaze, care au capacitatea de a degrada și înlătura activitatea antibiotică a penicilinei.

Astfel s'a constatat prezența unei penicilinaze la *B. coli*.

STREPTOMICINA

Streptomicina a fost pusă în evidență în filtratele culturilor unui microorganism care trăiește în pământ, *Actinomyces griseus* (Schatz, Bugie și Waksmann 1944).

Microorganismul este cultivat pe medii speciale și antibioticul este izolat din mediul de cultură după îndepărtarea massei miceliene prin centrifugare sau filtrare. Se adsoarbe streptomicina pe cărbune activ, se eluează în alcool metilic acid, se precipită cu eter și se purifică prin cromatografie pe coloană de alumină sau prin precipitare sub formă de reinekat [1]) sau heliantat.

PROPRIETĂȚI FIZICE ALE STREPTOMICINEI

Streptomicina este o pulbere gălbuie-pal, foarte higroscopică, solubilă în apă, în soluții saline 0,9%, insolubilă în solvenți organici. Sărurile ei au fost cristalizate și preparate în stare de mare puritate. Este stabilă, se conservă la răcitor fără să-și modifice proprietățile și un an de zile. Este rezistentă la variații de pH (2—9). Este extrem de rezistentă față de agenți biologici (bacterii, ciuperci, enzime), dar, în cursul autolizei, însuși *Actinomyces griseus* o distruge. Prin trecere prin filtre bacteriologice este foarte adesea inactivată.

STRUCTURA CHIMICĂ A STREPTOMICINEI

Streptomicina este o substanță cuaternară, conține C, H, O și N. Are formula brută: $C_{21}H_{39}O_{12}N_7$. Are caracter bazic, formează săruri cristalizate. Prin hidroliză în soluții acide diluate se descompune în două componente, și anume:

$$C_{21}H_{39}O_{12}N_7 \xrightarrow{H_2O} \underset{\text{streptidină}}{C_8H_{18}O_4N_6} + \underset{\text{streptobiozamină}}{C_1\ H_{28}O_9N}$$

Prima componentă conferă streptomicinei caracterul său bazic și poartă numele de streptidină, a doua componentă are caracterul unui dizaharid

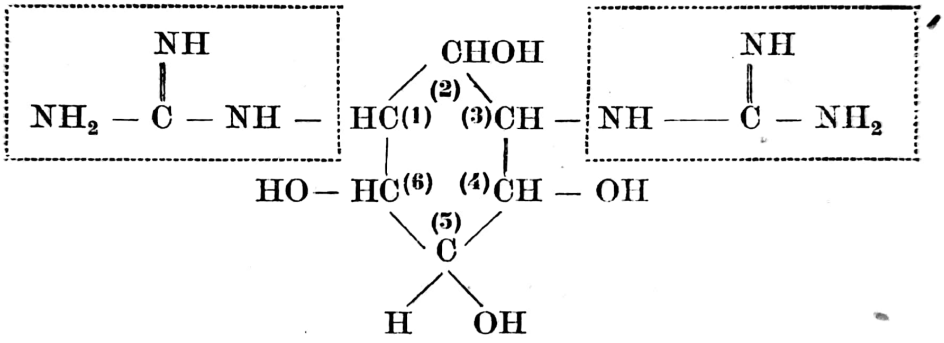
[1] Sarea lui Reinecke $[(C_6H_5)_4\ CrOCr\ (C_6H_5)_4]\ [Cr\ (CNS)_4(NH_3)_2]_2$.

aminat şi poartă numele de streptobiozamină; aceşti doi compuşi sunt uniţi în molecula streptomicinei printr'o legătură glucozinică. Două funcţii principale au fost puse în evidenţă în molecula streptomicinei, şi anume: un radical carbonil liber şi un radical amină secundară. Gruparea carbonil liberă a fost pusă în evidenţă prin spectrul de absorbţie caracteristic, iar radicalul amină secundară prin formarea de derivaţi nitroşi.

Structura streptomicinei.

Hidroliza unei sări a streptomicinei disolvată în metanol — acid clorhidric duce la formarea clorhidratului de streptidină, care poate fi izolat cromatografic pe coloană de alumină şi separat astfel de cealaltă componentă, streptobiozamina. Se mai poate separa streptidina sub formă de sulfat de streptidină, precipitat sub formă de cristale cu acid sulfuric n/1 dintr'o soluţie de clorhidrat de streptomicină.

Streptidina are formula brută $C_8H_{18}N_6O_4$; este 1, 3-diguanidino-2, 4, 5, 6-tetraoxiciclohexan; este o bază biacidă puternică. Are formula:

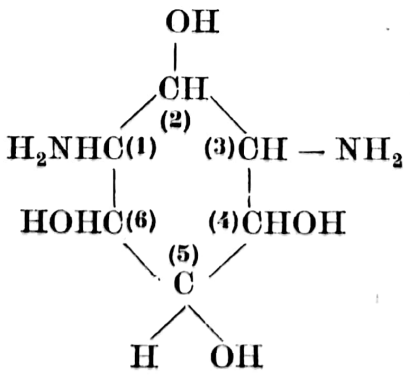


guanidină streptidină guanidină

Prezenţa grupărilor guanidice în moleculă a fost pusă în evidenţă prin reacţia Sakaguchi pe care o dă de altfel şi streptomicina.

Aportul de compuşi conţinând grupări guanidice în mediul de cultură favorizează extrem de mult capacitatea microorganismului de a elabora antibioticul.

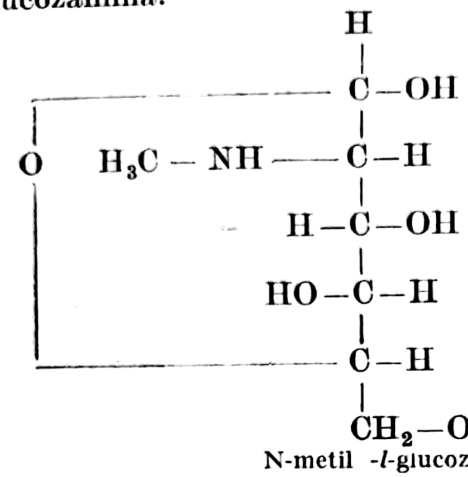
Prin hidroliza streptidinei în soluţie puternic alcalină (NaOH—6N) timp de 48 de ore se formează *streptamina*, compus care conţine în locul grupărilor guanidice grupări aminice.



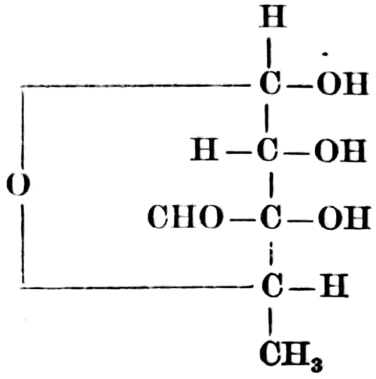
este 1,3 – diamino – 2,4,5,6 – tetraoxiciclohexan.

streptamină

Streptobiozamina este un dizaharid aminat format din două componente, streptoza sau streptonoza, o hexoză care nu conține azot și N-metil-*l*-glucozamina.



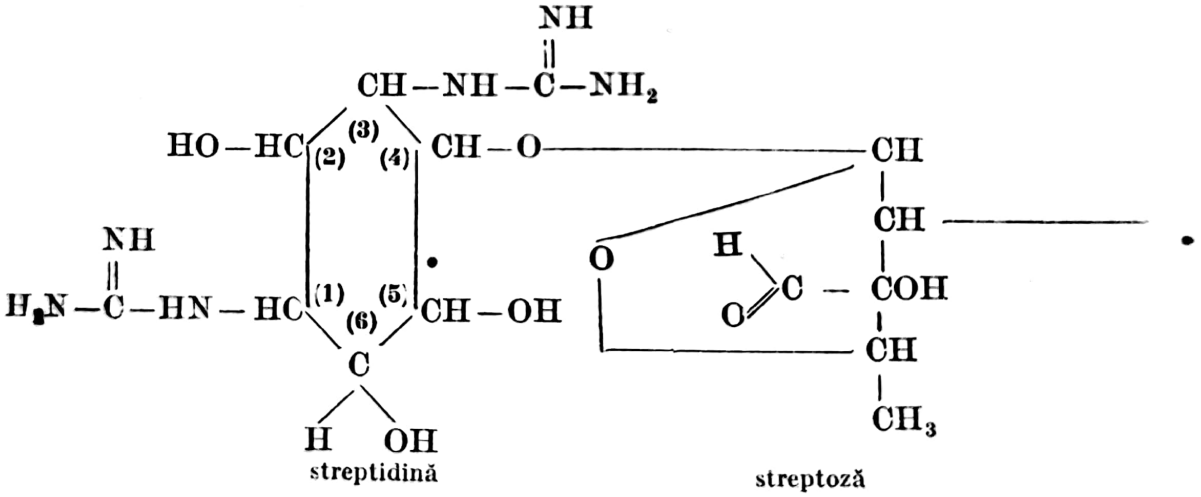
N-metil -*l*-glucozamină



streptoză

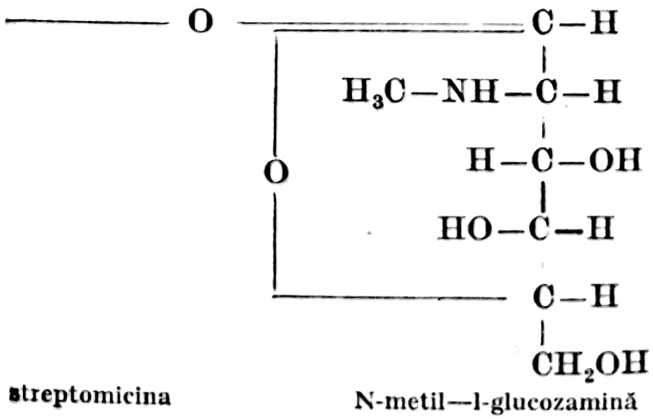
Este de remarcat faptul că N-metilglucozamina conține glucoza sub formă *l* și nu *d*, formă sub care se găsește în compușii naturali.

Unirea streptobiozaminei cu streptidina se face prin intermediul grupării hidroxilice dela C_1 al moleculei streptozei prin stabilirea unei legături glicozidice cu C_4 al streptidinei. C_1 din N-metilglucozamină se unește cu C_2 din molecula de streptoză. Streptoza stabilește astfel puntea de legătură dintre streptidină și N-metilglucozamină.



streptidină

streptoză



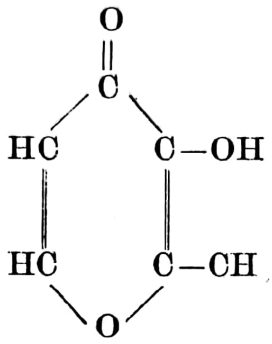
streptomicina

N-metil—l-glucozamină

Dihidrostreptomicina este derivatul redus al streptomicinei în prezența Pt sau Pd. Hidrogenul este fixat la gruparea carbonil din molecula streptozei, transformând-o în grupare alcool. Compusul astfel modificat păstrează activitatea antibiotică a streptomicinei, este însă mult mai stabil și nu este inactivat de cisteină.

Streptomicina B are o structură analoagă streptomicinei, dar conține în plus *d*-manoza.

Maltolul rezultă din streptomicină prin hidroliza acesteia în prezența alcalilor diluați (NaOH n/1); provine din desagregarea streptozei. Este maltol-2-metil-3-hidroxipironă și are structura:



pironmaltol

Componenta are o bandă de absorbție în ultraviolet caracteristică (2 750 Å); dă reacții de culoare caracteristice cu ioni ferici și cu reactivii fenolici și este folosită pentru determinarea chimică a streptomicinei însăși.

Metodele de determinare a streptomicinei

sunt:

1. **metode microbiologice** (cu ajutorul germenilor streptomicinosensibili), creșterea germenului fiind în funcție de activitatea antibioticului;
2. **metode fizice** (metoda polarografică);
3. **metode chimice**

a) dozarea maltolului, fie spectroscopic, fie cu reactivul fenolic sau ion feric;

b) dozarea grupării guanidinice,

c) dozarea grupării N-metil-*l*-glucozamină.

Unitatea de streptomicină cea mai frecvent folosită este unitatea „G" ponderală, și reprezintă cantitatea de streptomicină al cărei potențial antibiotic este egal cu acela al unui gamma de streptomicină. Un gamma de streptomicină este egal cu o unitate „S", adică cu cantitatea de streptomicină care într'un cc de mediu împiedică desvoltarea unei anumite tulpini de *B. coli*.

Puterea antibioticului într'un anumit mediu de cultură este influențată de o serie de condiții; este maximă la pH = 9, scade prin acidificare.

Glucoza și ureea au o acțiune neutralizantă asupra streptomicinei, proteinele au efect depresor. Streptomicina este inactivată de derivații sulfurați (cisteină, acid tioglicolic), substanțe oxidante (acid ascorbic). Inhibitorii enzimatici (acidul monoiodacetic, fluorura de sodiu) stimulează acțiunea streptomicinei. Obținerea streptomicinei pe scară comercială și purificarea ei constitue un proces destul de complicat (astfel, 1 kg streptomicină necesită 400 000 kg materii prime).

Spectrul bacteriostatic al streptomicinei se extinde asupra bacteriilor Gram pozitive şi Gram negative şi, fapt important, asupra bacilului tuberculos. Streptomicina se fixează pe bacteriile sensibile, lucru pus în evidenţă prin liberarea streptomicinei de pe suprafeţele germenului. Această fixare cere un anumit timp şi urmează o anumită lege de repartiţie a antibioticelor între bacterie şi mediul de cultură. Efectul bacteriostatic sau bactericid va fi declanşat numai pentru concentraţii de streptomicină intrabacteriene suficient de ridicate.

Modificările morfologice suferite de bacterii sub efectul streptomicinei sunt modificări de afinitate tinctorială (bacilul tuberculos pierde acidorezistenţa) şi modificări morfologice, constând într'un poliformism, cu îngroşarea şi alungirea microbilor.

Streptomicina, modifică intensitatea respiratorie a germenilor sensibili. In concentraţii mici stimulează respiraţia, în concentraţii mari o inhibă.

Streptomicina modifică activitatea enzimatică a germenilor sensibili (catalaza, lipaza, ureaza, dehidrazele).

Ea ar interfera în metabolismul microbian probabil printr'o blocare a grupărilor sulfihidrilice din sistemele enzimatice esenţiale. Intr'adevăr, s'a constatat că cisteina are un puternic efect inhibitor asupra streptomicinei şi se crede că acţiuni chimice analoage au loc în celulă.

Studiul acţiunii streptomicinei asupra diverselor enzime (catalază, dehidrogenaze, urează, lipază, triptofanază) arată în unele condiţii o stimulare, în altele o inhibare, tot în funcţie de concentraţia antibioticului în raport cu densitatea microbiană. In aceste condiţii, sub acţiunea antibioticului, consumul de oxigen şi în general întregul metabolism celular se modifică.

Principiile antibacteriene pot ataca astfel sistemul respirator sau alte sisteme enzimatice esenţiale pentru bacterie.

S'a constatat că streptomicina inhibă în anumite condiţii oxidarea acidului fumaric şi piruvic, deci inhibă procesul respirator final, ca şi oxidarea exogenă şi endogenă a ribonucleatului.

Unii autori susţin că streptomicina precipită acizii nucleici, combinându-se cu aceste componente celulare de bază şi astfel s'ar explica acţiunea antibiotică asupra bacteriilor.

Deasemenea s'a demonstrat interferenţa cu grupările sulfhidrilice, grupări esenţiale pentru diviziunea celulară.

Streptomicina (şi în special penicilina) este puternic inhibată de cisteină şi alţi compuşi cu radicali sulfhidrilici.

Acest fapt arată ca probabilă acţiunea streptomicinei asupra grupărilor sulfhidrilice din sistemele enzimatice cu rol esenţial în metabolismul bacterian.

GRAMICIDINA ŞI TIROCIDINA

Gramicidina şi tirocidina sunt două antibiotice de origină bacteriană preparate de Dubos (1939) din *B. brevis*, o bacterie izolată din pământ. Aceste două antibiotice constitue iniţial un amestec cunoscut sub numele de tirotricină. Au fost separate din acest amestec prin tratare cu acetonă-eter, gramicidina care este solubilă, de tirocidina insolubilă. Ele au fost obţinute sub formă cristalizată.

Scanned with OKEN Scanner

Ambele antibiotice au structură polipeptidică cu greutate moleculară mică (3 000 sau mai puţin). Prin hidroliză eliberează aminoacizi şi, fapt extrem de important, conţin o mare parte din aceştia sub forma lor nenaturală *d*. Gramicidina conţine 50% *d*-aminoacizi.

Gramicidina

Se obţine sub formă de cristale plate, insolubile în apă, uşor solubile în acetonă şi alcool. In soluţie alcoolică este optic activă, dextrogiră. Are o greutate moleculară de aproximativ 2 800, nu este scindată de enzimele proteolitice, nu are grupări bazice şi acide libere.

Prin hidroliză eliberează 5 aminoacizi şi etanolamina. Aceşti aminoacizi sunt *d*-leucina, *l*-triptofanul, *d-l*-valina, *l*-alanina, glicocolul. Cu ajutorul *d*-aminooxidazei s'a dovedit că formele *d* sunt în proporţie de aproximativ 50%.

Cercetătorii sovietici G. F. Gause şi M. G. Braznicova au izolat o substanţă cristalină elaborată de un bacil din sol, din grupul *Brevis*, substanţă cu structură polipeptidică, pe care o notează gramicidina „S"-gramicidina sovietică — care se pare că ar fi constituită dintr'un ciclu decapeptidic, având în cantităţi echimoleculare următorii aminoacizi determinaţi pe cale cromatografică: *l*-valina, *l*-ornitina, *l*-leucina, *d*-fenilalanina, *l*-prolina. Posedă o grupare bazică liberă; nu are grupare acidă liberă. E combinată cu un radical de clor. Gramicidina „S" este un ciclopeptohidroclorid. Prezenţa *l*-ornitinei şi *d*-fenilalaninei este o caracteristică cu totul specială şi care nu se regăseşte la compuşii naturali.

Gramicidina Dubos are acţiune bacteriostatică dar nu bactericidă faţă de toate organismele Gram pozitive, nu faţă şi de cele Gram negative. Este toxică pentru animal, ceeace limitează utilizarea doar în tratamentul local al infecţiilor. Gramicidina „S" are însă acţiune internă şi asupra bacteriilor Gram negative. Are astfel analogie cu tirocidina, dar e mai simplă ca structură.

Tirocidina

Este tot un polipeptid, având însă grupări bazice libere. Prin hidroliză eliberează următorii aminoacizi: fenilalanina, leucina, prolina, valina, tirozina, acidul glutamic, acidul aspartic, triptofanul şi ornitina. Este bacteriostatică pentru toţi germenii Gram pozitivi şi Gram negativi. Este însă prea toxică pentru a avea o aplicare terapeutică.

S'a constatat că gramicidina măreşte viteza de respiraţie a germenilor sensibili, de exemplu la *Staphylococcus aureus* şi inhibă fixarea fosfatului anorganic, care în mod normal este asociat cu respiraţia. Acest fapt sugerează ideea că acţiunea bacteriostatică a acestui antibiotic ar fi datorită unei modificări a metabolismului normal: ea stimulează calea de degradare nefosforilată a glucidelor, cea fosforilată fiind calea normală.

Gramicidina, ca şi o serie întreagă de antibiotice, are acţiune bacteriostatică, dar nu bactericidă, cu alte cuvinte, acţiunea ei este de modificare metabolică, de unde rezultă incapacitatea celulei de a folosi energia pentru procesele de creştere şi diviziune celulară.

Se ştie cât de important este mecanismul fosforilării pentru depozitarea şi transferul energetic. Orice acţiune care stânjeneşte posibilitatea de for-

Scanned with OKEN Scanner

mare a legăturilor fosfat puternic energetice împiedică probabil sinteza celulară.

Gramicidina inhibă acumularea polizaharidelor, fixarea de fosfat, multiplicarea celulelor. Liza provocată de tirocidină este un fenomen secundar unei alterări primare a membranei celulare. Tirotricina inhibă dehidrogenarea enzimatică a glucozei, a alcoolului etilic, a acidului lactic, fumaric (Blinicova E. J.) Dehidrogenazele și creșterea unui anumit germen sunt inhibate de exact aceleași concentrații de tirotricină.

Toxicitatea gramicidinei limitează aplicarea acestui antibiotic la infecțiile externe (plăgi infectate) sau ca preventiv.

AUREOMICINA

Aureomicina este un antibiotic elaborat de *Streptomyces aureofaciens.* Este folosit sub formă de clorură. Concentrații în doze de 1—5 μg/cc inhibă creșterea multor germeni Gram pozitivi și a unor specii Gram negative.

AEROSPORINA

Aerosporina este un antibiotic elaborat de bacilul *B. aerosporus* Green. Este o substanță bazică, ninhidrinopozitivă, optic activă, cu caracter polipeptidic bazic. Este de fapt formată dintr'un grup de polipeptide. Conține treonină și fenilalanină.

Este activă față de organismele Gram negative.

Printre antibioticele de natură animală citățm *lizozimul.* Se găsește în albușul de ou, în laptele matern, în salivă, în lichidul lacrimal, unde are rol protector pentru ochi. Are caracterul unei enzime, este o carbohidrază. Are acțiune asupra diverselor microorganisme. Se pare că are o acțiune de desintegrare a capsulei bacteriene.

S'au mai izolat antibiotice din țesuturi animale, și anume din ficatul de iepure, placenta umană, care inhibă unele microorganisme Gram pozitive.

ERITRINA

Eritrina este un antibiotic izolat din eritrocitele mamiferelor (Zilber și Iacobson). Are acțiune antibiotică asupra multor germeni (numai germeni Gram pozitivi) și în special asupra b. difteric, nu este toxică, este stabilă. Este un antibiotic cu acțiune locală, nu pătrunde în țesuturi.

MECANISMUL GENERAL DE ACȚIUNE AL ANTIBIOTICELOR

Acțiunea antibioticelor este în general bacteriostatică pentru concentrațiile mici și bactericidă pentru concentrațiile mari.

Acțiunea bacteriostatică și bactericidă sunt în funcție și de durata contactului dintre bacterie și antibiotic. Tulpini diferite ale aceluiaș germen pot avea însă sensibilități diferite față de acelaș antibiotic.

Stadiul evolutiv al bacteriei este foarte important pentru acțiunea antibioticului Multiplicarea activă a germenului, corespunzătoare fazei logaritmice de creștere, favorizează acțiunea antibiotică. Acțiunea antibioticului este influențată de prezența diverselor substanțe din mediul

de cultură (unele sunt stimulante, altele inhibante) şi de densitate microbiană; cu cât este mai mare densitatea microbiană cu atât este mai mare concentraţia necesară unei activităţi eficace a antibioticului. Alungirea celulei microbiene sub acţiunea antibioticului este o alterare morfologică din cele mai constante; ea indică o inhibare a procesului de diviziune. Oprirea diviziunii celulare este datorită probabil inhibării unui mecanism enzimatic care în cazul unei acţiuni bacteriostatice a antibioticului poate să se refacă dacă agentul inhibant e înlăturat, iar în cazul unei acţiuni bactericide a devenit ireversibil. Mecanismul de acţiune al antibioticelor constă în esenţă într'o interferare a acestora cu unele procese metabolice esenţiale ale celulei bacteriene, într'o interferare cu una sau unele din funcţiile vitale ale celulei, prin următoarele căi:

1. combinarea cu unul din componentele esenţiale ale celulei;
2. competiţie cu o enzimă necesară bacteriei pentru un substrat esenţial;
3. competiţie pentru o componentă metabolică esenţială a celulei;
4. blocarea unor funcţii chimice sau enzimatice esenţiale;
5. interferenţă cu utilizarea vitaminelor;
6. modificări fizico-chimice esenţiale (tensiune superficială, potenţial de oxidoreducere).

Toate aceste căi rezumă însă varietatea mare de modificări disparate care întovărăşesc acţiunea bacteriostatică şi bactericidă a diverselor antibiotice şi duc la inhibarea diviziunii celulare, respectiv la moartea celulei. Ele demonstrează cât de numeroase şi multiple sunt căile de atac ale antibioticului.

Studiul acţiunii unui antibiotic trebue făcut astfel prin urmărirea complexului de reacţii metabolice în condiţii în care antibioticul nu acţionează asupra microorganismului şi în condiţii în care acesta acţionează efectiv, bacteriostatic sau bactericid.

Studiul influenţei antibioticelor asupra respiraţiei germenilor sensibili la acţiunea acestora pune în lumină o serie de fapte interesante. Respiraţia lui *Staphylococcus aureus* în culturile tinere este stimulată de concentraţii mici şi inhibată de concentraţii mai mari. Este evident că respiraţia normală nu este totodată respiraţia maximă posibilă; o creştere marcată pentru câteva ore poate fi urmată de o descreştere atunci când au loc modificări celulare mai profunde. Respiraţia stafilococului auriu în culturi tinere este inhibată la concentraţii de 0,016 unităţi penicilină pe cc. Efectul asupra respiraţiei microbiene persistă chiar pentru concentraţii subbacteriostatice sau subbactericide. Efectul asupra culturilor mai bătrâne este mai slab.

Studiul influenţei streptomicinei asupra respiraţiei unor serii de germeni (*B. proteus*, bacilii tuberculoşi) pune în evidenţă o acţiune de stimulare a micilor concentraţii de antibiotic şi o acţiune de inhibare la concentraţii mai mari. Această acţiune este însă în funcţie de fazele ciclului de creştere a germenilor sensibili, microorganismele în activitatea metabolică intensă fiind mai sensibile la acţiunea antibioticului. Efectul antibioticului este cel mai net în faza de creştere logaritmică.

Atât penicilina cât şi streptomicina *modifică aşa dar metabolismul oxidativ al celulei bacteriene*. Această modificare poate fi realizată însă pe căi identice pentru diversele antibiotice sau pe căi proprii, specifice fiecărui antibiotic şi poate să fie rezultatul unui singur mecanism de bază.

Scanned with OKEN Scanner

Blocarea grupărilor sulfhidrilice pare să fie un mecanism comun acțiunii celor mai multe antibiotice cu structură chimică heterogenă. ca și al unor serii de substanțe chimice cu acțiune bactericidă. Grupările sulfhidrilice sunt esențiale pentru activitatea multor enzime. Activitatea a numeroase enzime este dependentă de prezența grupărilor —SH libere; blocarea lor duce la inactivarea enzimei, a cărei activitate poate fi restabilită prin adăugare de compuși sulfhidrilici (glutation, cisteină, etc.). Acțiunea de inhibare selectivă a grupărilor —SH de către diverse substanțe este datorită probabil unei posibilități de acces diferite a acestei substanțe la grupările sulfhidrilice din structura diverselor enzime. Diferența în reactivitate față de compușii sulfhidrilici poate duce și la o diferențiere a manifestărilor mecanismului inhibitor la nivelul sistemelor enzimatice.

S'a constatat că cisteina poate suprima acțiunea antibiotică a penicilinei și a streptomicinei, probabil prin rolul de donator de grupare — SH, de blocare a acestei grupări; un mecanism analog are loc probabil și în raport cu grupările sulfhidrilice din celula bacteriană. Diverși autori interpretează acțiunea bacteriostatică a acestor antibiotice prin oxidarea grupării — SH în grupare —S — S —. Se corelează astfel modul de acțiune al penicilinei, respectiv al streptomicinei, cu oxidarea grupărilor —SH. Intr'adevăr, în studiile asupra inhibării lui *Staphylococcus aureus* de către penicilină, zonele în care celulele nu sunt inhibate dau testul pozitiv pentru grupările —SH, pe când, în zonele inhibate, testul este negativ.

Faptul că germenii Gram pozitivi devin sub acțiunea penicilinei Gram negativi, implică deasemenea o oxidare a grupării —SH. S'a dovedit că în complexul Gram pozitiv din germeni intră ribonucleatul de magneziu asociat cu gruparea —SH. Oxidarea ei în grupare — S — S — schimbă colorabilitatea complexului.

Implicarea grupelor —SH cisteinice în procesul de diviziune celulară a bacteriilor este un fapt care merită să fie semnalat și pare verosimil a privi inhibarea diviziunii celulare ca rezultatul inhibării unui mecanism enzimatic dependent de grupările —SH libere.

Se știe că o modificare morfologică caracteristică acțiunii antibioticelor este alungirea celulei bacteriene; diviziunea ei este inhibată, dar nu și creșterea. Pare verosimil a privi inhibarea diviziunii ca inhibarea unui mecanism enzimatic care se poate reface atunci când agentul inhibant e înlăturat. Faptul că antibioticele lucrează în concentrații extrem de mici pledează pentru concepția unei acțiuni a acestora asupra punctelor specifice ale celulei, ca de exemplu asupra grupelor —SH cu transformarea lor în grupe — S — S —. Abilitatea unei celule de a crește poate să conste în capacitatea de a sintetiza proteine fibroase elastice, iar abilitatea de a se divide, în potențialitatea ei de a preveni formarea de legături disulfidice, care are ca rezultat o pierdere a elasticității moleculare. Importanța grupărilor —SH, —S—S— în acest proces a fost pusă în evidență. Se poate ca diviziunea celulară să fie întovărășită de o reorânduire a configurației proteinelor celulare, având ca rezultat sporirea grupărilor —SH. Evidența corelațiilor dintre sinteza proteinelor și metabolismul acizilor nucleici face posibil ca diviziunea celulară și implicit acțiunea antibioticelor să fie corelată cu metabolismul acestor componente fundamentale. Experiențele în această direcție sunt însă incomplecte și sporadice. Astfel s'a constatat că penicilina inhibă ribonucleaza, ceeace indică una din acțiunile care ar putea turbura metabolismul acidului ribonucleic în fa-

Scanned with OKEN Scanner

voarea unei acumulări a acestei componente. S'a constatat deasemenea că streptomicina precipită acizii nucleici.

Cercetări ale variației potențialului de oxidoreducere în mediul de cultură a germenilor supuși acțiunii penicilinei sau streptomicinei arată o creștere a acestui potențial. S'ar părea că antibioticele lucrează prin oxidarea mediului, adică prin absorbție de energie liberă, acționând astfel prin competiție cu mecanismele fizico-chimice ale celulei bacteriene care produce energie liberă în mediu pentru a o folosi în creșterea și diviziunea ei. Variațiile potențialului de oxidoreducere sunt astfel expresia absorbției de către antibiotice a energiei libere produse de enzimele de oxidoreducere ale germenilor. Și antibioticele ar putea lucra astfel la rândul lor ca sisteme de oxidoreducere.

Cunoștințele actuale asupra modului de acțiune a antibioticelor sunt încă incomplecte, domeniul de cercetare fiind încă în plină desvoltare.

REZISTENȚA LA ANTIBIOTICE

Se înțelege prin rezistență la antibiotice absența susceptibilității unui germen la acțiunea toxică a acestora. (Germenii Gram negativi sunt astfel natural rezistenți la acțiunea penicilinei, iar susceptibilitatea diverșilor germeni Gram pozitivi, la acțiunea penicilinei variază în limite destul de mari).

Se înțelege prin „rezistență indusă" sau „rezistență câștigată", rezistența microorganismelor obținută prin subculturi repetate în medii conținând concentrații crescânde de antibiotic. In unele cazuri, în afară de o desvoltare graduală a rezistenței, la fiecare transferare are loc o transformare bruscă cu producerea, într'o singură etapă, de colonii permanent rezistente la concentrații foarte mari de antibiotic.

Rezistența indusă apare frecvent și constitue unul din inconvenientele importante ale aplicării practice a antibioticelor în tratamentul bolilor infecțioase. Ea pune problema mecanismului fiziologic al rezistenței și al modificărilor pe care le induce antibioticul pentru crearea acestei rezistențe.

Origina formelor rezistente este o problemă încă desbătută. O dificultate importantă în rezolvarea acestei probleme, a rezistenței câștigate de către o cultură bacteriană, este numărul mare de celule individuale folosite în acest studiu și dificultatea de a urmări modificările de metabolism ale unei singure celule. Există două ipoteze care caută să explice origina formelor rezistente :

1. adaptarea la noile condiții prin modificări ale metabolismului celular și

2. selecția indivizilor originar rezistenți care se găsesc în populația inițial heterogenă sau selecția dintr'o populație heterogenă a acelor celule care au reușit să-și modifice metabolismul sub acțiunea antibioticului.

Cercetările școlii sovietice au arătat că primul mecanism, acela al modificărilor metabolice, intervine în procesul variației microbiene, rezistența la antibiotice fiind un caz particular al acestei variații. Modificări ale activității enzimatice întovărășesc aproape totdeauna apariția de variații microbiene, astfel că rezistența la antibiotice este, în ultimă analiză, un proces de adaptare la noile condiții de viață datorite unei modificări a metabolismului celular dirijat de complexul enzimatic.

Scanned with OKEN Scanner

Echilibrul enzimatic al celulei în creştere este modificat de prezenţa antibioticului de aşa manieră, încât efectul inhibitor al acestuia asupra creşterii celulei este neutralizat. Alteraţii ale echilibrului enzimatic ca rezultat al modificărilor mediului exterior pot avea loc şi fără apariţia de noi enzime.

Adăugarea unui anumit compus organic unei culturi în creştere poate altera după voinţă caracterul morfologic şi imunologic, precum şi capacitatea de sinteză a unei populaţii bacteriene. Acidul nucleic izolat din pneumococul tip III omorît prin căldură şi adăugat unei culturi de pneumococ necapsulat nevirulent (tip II) produce o transformare. Organismul tip II este transformat în organism tip III fără a putea fi diferenţiat imunologic sau morfologic de tipul III originar, din care s'a izolat acidul nucleic. Acizii nucleici din acest organism tip III nou format sunt capabili de a induce noi transformări ale altor culturi. Nu există îndoială că acidul nucleic acţionează asupra culturii de tip II printr'o alterare a capacităţii ei enzimatice, astfel că acest germen devine capabil de a sintetiza polizaharidul specific care formează capsula caracteristică pentru tipul III. Variaţia provocată nu era întâmplătoare, ci dirijată în sensul fixat dinainte, şi anume, corespunzător celulei capsulate din care a fost izolată substanţa inductoare a transformării. Aceasta poate sugera acţiuni analoage pentru antibiotice, fiind un exemplu de inducţie a unei modificări controlate şi dirijate.

Acţiunea substanţelor chimioterapice şi în special a antibioticelor ca factori de interferare şi interacţiune cu metabolismul celular apare clară în cazul streptomicinei. Streptomicina nu acţionează decât în prezenţa unei cantităţi suficiente de substanţe nutritive. Penicilina acţionează deasemenea numai în condiţii de temperatură şi nutriţie în care germenul ca atare, în absenţa antibioticului, se desvoltă în condiţii favorabile. Apare clar că aceste antibiotice nu sunt toxice protoplasmatice şi nu acţionează printr'o denaturare a proteinelor, ca de exemplu dezinfectanţii bacterieni obişnuiţi; interferarea cu procesele metabolice esenţiale apare astfel ca un mecanism de acţiune al acestor antibiotice.

Am văzut în cazul penicilinei că pierderea abilităţii de a acumula acidul glutamic întovărăşeşte apariţia fenomenului de rezistenţă la germenii Gram pozitivi. Şi acţiunea streptomicinei este desigur intim legată de un proces metabolic, lucru care reiese şi din observaţia importantă că tulpini de meningococ, devenite streptomicino-rezistente, au nevoie ulterior de streptomicină ca de o componentă nutritivă. Acest lucru a fost regăsit şi la unele microbacterii, şi la *Escherichia coli*. S'a mai constatat că streptomicina, în limite subbacteriostatice, lucrează ca un stimulent al creşterii.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL XI

BIOCHIMIA BACTERIILOR ŞI VIRUŞURILOR

Partea I

BIOCHIMIA BACTERIILOR

Constituţia biochimică şi procesele metabolice ale celulei bacteriene prezintă o mare analogie, atât cu procesele celulei vegetale cât şi cu acelea ale celulei animale. Datele obţinute din studiul biochimic şi fiziologic al microorganisme or au folosit adesea înţelegerii fenomenelor care au loc în celulele organismelor mai complexe.

Bacteriile sunt caracterizate printr'o enormă capaçitate de multiplicare şi printr'o activitate metabolică extrem de intensă. Această activitate metabolică variază însă cu o serie întreagă de factori externi (mediul de cultură, etc.) cu specia şi tipul microbilor, şi pentru acelaş germen, cu fazele ciclului său de creştere. Este necesar a defini care sunt aceste faze ale ciclului de creştere, deoarece întreaga caracterizare biochimică şi fiziologică a unui germen dat este în funcţie de aceste faze.

FAZELE DE CREŞTERE ALE BACTERIILOR

Creşterea unei populaţii bacteriene într'un mediu adecvat tinde să urmeze o curbă caracteristică, ce se poate exprima grafic prin logaritmul numărului bacteriilor în funcţie de timp (fig. 178).

Se disting patru faze mari:

1. **Faza de latenţă** (faza de lag) ţine din momentul însămânţării culturii, când creşterea este aparent oprită pentru un scurt interval de timp, până când începe să devină vizibilă, dar lentă.

2. **Faza exponenţială** (logaritmică). In această fază cultura creşte cu o câtime constantă, cu viteză maximă. Viteza de creştere este proporţională cu bogăţia culturii microbiene.

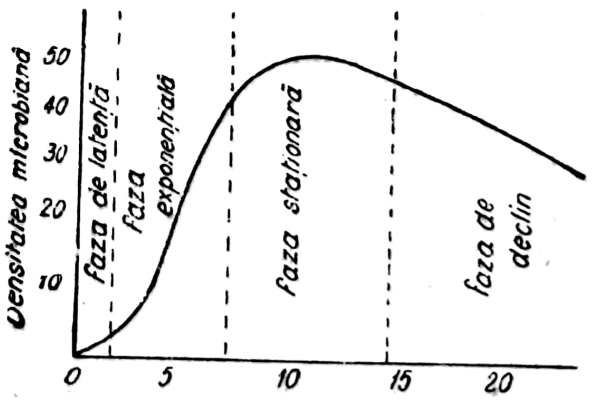


Fig. 178. Fazele ciclului de creştere a bacteriilor. Curbă de creştere a bacteriilor

3. **Faza staţionară** este caracterizată prin faptul că celulele încetează să se multiplice cu viteză maximă până ce se stabileşte un echilibru între celulele care se divid şi cele care mor.

4. **Faza de declin** este caracterizată printr'o oprire a reproducerii celulelor; după un anumit timp, cultura devine sterilă.

Morfologia, metabolismul celulei bacteriene şi întreaga viaţă fiziologică a celulei bacteriene variază în funcţie de aceste faze ale ciclului de creştere.

La sfârşitul fazei de latenţă, activitatea metabolică creşte şi se menţine crescută de-a-lungul fazei exponenţiale, pentru a descreşte apoi în timpul fazei staţionare şi foarte mult în faza de declin.

Sensibilitatea bacteriilor la antibiotice este deasemenea în funcţie de aceste faze, fiind maximă în faza exponenţială a ciclului lor de creştere.

COMPOZIŢIA CHIMICA A BACTERIILOR

Cunoaşterea structurii chimice a bacteriilor este importantă; deoarece toate funcţiile celulei sunt asociate cu modificările chimice ale acestei structuri.

Determinarea compoziţiei chimice a celulei bacteriene de diverse specii este însă mult îngreuiată datorită modificărilor induse de mediul de cultură. Aceste modificări, datorite unui proces de adaptare, creează variante microbiene ce se deosebesc de tipul de plecare printr'o serie de caracteristici metabolice esenţiale.

Standardizarea condiţiilor de cultură cu ajutorul mediilor sintetice ar fi singura cale pentru o justă apreciere a componenţei chimice a diverşilor germeni.

Pentru studiul componenţei chimice a bacteriilor au fost folosite metode histochimice şi metode chimice de analiză directă.

Metodele histochimice folosesc reacţiile chimice specifice ale diverselor componente chimice din celulă, acestea fiind puse în evidenţă cu ajutorul microscopului; de exemplu, reacţiile amidonului cu iodul, ale grăsimilor cu acidul osmic.

Metodele histochimice au avantajul de a da indicaţii asupra localizării în celulă a diverselor componente, dar nu pot fi folosite ca metode cantitative.

Metodele chimice propriu zise se raportează însă la întreaga celulă bacteriană şi pot da indicaţii cantitative asupra conţinutului acesteia în diversele componente chimice.

Vom vedea că prezenţa sau absenţa unor anumite componente chimice (polizaharide, lipide, etc.) poate caracteriza şi diferenţia anumite specii bacteriene.

Celula bacteriană conţine aceleaşi bioelemente ca oricare altă celulă vegetală sau animală (C, O, H, N, P, S, substanţe minerale în concentraţii variabile, unele din ele sub formă de aglomerate).

COMPOZIŢIA ELEMENTARĂ A MICROORGANISMELOR

Carbonul variază între 22—42% (*Azotobacter chriococum*) şi 64,06% (*Mycobacterium tuberculosis*), în majoritate însă între 45%—55%; virusurile purificate conţin 50%C.

Azotul variază între 8,28—15,03%, la virusuri între 13—16%.
Fosforul variază între 2,5—5%.

Conținutul în apă al celulei bacteriene

Valorile date pentru conținutul în apă al celulei bacteriene variază între 73,35—87,80% din greutatea umedă a acesteia (media 80%). Astfel: *Mycobacterium tuberculosis* 85,9%, *Escherichia coli* 73,35%, *Corynebacterium diphteriae* 84%, etc. Sporii care au o viață vegetală au un conținut mai mic (40—50%).

Substanțele minerale

Conținutul în cenușă este cuprins între 1,34—13,86%. Acest conținut variază deci în limite foarte mari și este în funcție de specia microbiană de varianta microbiană și de mediul de cultură.

Cenușa bacteriană este dată în special de P, Na, K și Ca.

Alte minerale se găsesc în cantități mai mici.

Substanțele organice sunt:

— proteice — separabile prin precipitare cu acizi;

— neproteice — constituite din aminoacizi liberi, amoniac, peptide, baze purinice și pirimidinice;

— peptide (glutation, gramicidină, tirocidină).

Proteinele microorganismelor

Proporția cea mai mare de substanță organică din celula bacteriană este dată de proteine. Raportate la greutatea uscată, substanțele proteice pot varia între 12,5—87,5%. Aceste proteine se găsesc fie sub formă de holoproteide (globulină), fie sub formă de heteroproteide (glucoproteide, lipoproteide, fosfoproteide, nucleoproteide). Prin hidroliză se obțin componentele din structura heteroproteidelor și degradarea proteinelor până la aminoacizii componenți.

Structura proteinelor bacteriene este încă incomplect cunoscută.

Proteina bacteriană cea mai bine cunoscută este proteina extrasă din bacilul tuberculozei (tuberculoproteine).

Componența în proteide a germenilor variază cu o serie de factori (tipul microbian, mediul de cultură, vârsta culturii, etc.).

Nucleoproteidele. Bacteriile sunt caracterizate printr'un conținut extraordinar de mare în proteine și acizi nucleici, sub formă de nucle-proteide și polinucleotide libere (acizi nucleici). Proteina și acizii nucleici pot fi legate în diverse feluri.

A. N. Belozerschi presupune că în condiții biologice dependente de mediul extern aminogrupările proteinelor se pot grupa cu cantități variabile de acizi nucleici și cu acizi nucleici calitativ diferiți, ceeace trebue să influențeze fără îndoială comportarea lor în citoplasmă. Natura legăturii este condiționată de starea fiziologică a celulei.

In culturile cu celule bacteriene tinere se constată o creștere a cantității absolute de nucleoproteine și o legătură mai slabă între componentele nucleoproteinelor nucleare. Imbătrânirea culturii duce la descreșterea cantității absolute de nucleoproteină nucleară și a conținutului în acid

Scanned with OKEN Scanner

nucleic, precum și la desfacerea legăturii acestuia cu proteina. Procesul a fost observat în special la *Spirillum volutans* (Belozerschi A. N. 1941). In timpul diviziunii celulare, acidul nucleic (acidul desoxiribonucleic) din nucleu este într'o strânsă legătură cu proteina.

Nucleoproteinele din celulele bacteriene pot fi extrase cu ajutorul soluțiilor alcaline slabe. Trebue evitate concentrațiile saline puternice pentru a nu altera sau desface legătura dintre proteină și acizii nucleici.

Cercetările au arătat că bacilul tuberculozei conține o cantitate mare de nucleoproteine pe care le elaborează în mediul de cultură. Tuberculoproteina din mediul de cultură conține o mare cantitate de acid desoxiribonucleic. A. N. Belozerchi indică pentru o serie de germeni valori ale nucleoproteinelor care variază între 50—80% din celulă. Streptococul hemolitic are un conținut de 80% nucleoproteină. Celula bacteriană este caracterizată printr'un conținut mare în substanță nucleară și lucrări recente au arătat existența unui nucleu diferențiat la majoritatea bacteriilor.

Componenta proteică din nucleoproteina bacteriană este incomplect cunoscută. Cercetările lui A. N. Belozerschi și ale colaboratorilor indică absența în acești compuși a proteinelor cu caracter bazic de tipul histonelor sau protaminelor și consideră că proteina din nucleoproteina bacteriană trebue să aparțină proteinelor cu moleculă mare.

Acizii nucleici. Studiul acizilor nucleici apare ca o problemă centrală pentru cunoașterea fiziologiei celulare, ei constituind, după ultimele cercetări, factorii de control al desvoltării celulare. Acizii nucleici sunt componente obligatorii ale celulelor tuturor organismelor bacteriene, ele fiind excepțional de bogate în aceste unități structurale asociate cu funcții biologice importante.

Acizii nucleici din celula bacteriană aparțin celor două tipuri, ca și la ființele superioare, și anume acizilor ribonucleici și desoxiribonucleici.

Conținutul în acizi nucleici totali variază între 5 și 20% (din greutatea uscată), ceeace indică o bogăție excepțională în aceste componente, depășită numai de celulele timusului și de spermatozoizi.

Conținutul în acid desoxiribonucleic variază pentru diversele bacterii între 1—5% (din greutatea uscată), deci aproximativ un sfert din acizii nucleici totali, iar acela al acidului ribonucleic între 5—25% (din greutatea uscată), deci trei sferturi din acizii nucleici totali.

Aceste valori variază însă cu o serie de factori, și anume cu specia bacteriană, tipul bacterian, condițiile culturale și, în mare măsură (în special pentru acidul ribonucleic), cu starea fiziologică a celulei bacteriene.

Dăm pentru câțiva germeni valorile acizilor nucleici totali, precum și ale acidului desoxiribonucleic și ribonucleic (culturi de 18—20 de ore) (vezi tabelul 80).

Tabelul 80

Specia bacteriană	Acizi nucleici totali	Acid desoxiribonucleic	Acid ribonucleic
Stafilococ	11,57	2,82	8,75
B. tific.	12,84	3,72	9,12
Colibacil	13,90	4,17	9,73
Vibrion holeric	3,67	1,59	2,08
B. piocianic	9,35	4,42	4,93
B. subtilis	5,87	1,47	4,40
B. difteric	6,54	1,68	4,86

La un acelaș microb acidul desoxiribonucleic este relativ acelaș în cursul diverselor faze ale ciclului de creștere. Acidul ribonucleic, dimpotrivă este foarte variabil în funcție de aceste faze.

Cantitatea maximă se constată în perioada de latență, adică în perioada în care sintezele celulare bacteriene sunt cele mai intense.

Semnificația acizilor nucleici bacterieni

1. **Acidul desoxiribonucleic.** Acidul desoxiribonucleic este localizat în nucleul celulei bacteriene, fapt dovedit în ultimii ani cu ajutorul unor tehnici adecvate. Multă vreme s'a contestat existența unui nucleu bine diferențiat, atribuindu-se celulei bacteriene un nucleu difuz.

Prin tratarea bacteriilor cu acid clorhidric la o temperatură ridicată (60°), spălare și colorare ulterioară, s'a dovedit existența unui nucleu central. Acidul clorhidric înlătură acidul ribonucleic din citoplasmă, astfel că nucleul apare clar. Folosind ribonucleaza, enzima de depolimerizare specifică a acidului ribonucleic, acesta este eliminat, astfel că după colorare apare net nucleul din celulă sub forma unei masse dense a cărei dimensiune este de aproximativ jumătate micron. Nucleul a fost constatat la o serie întreagă de bacterii, este destul de mare, aproape jumătate din diametrul bacteriei și este de natură desoxiribonucleinică, acidul desoxiribonucleic puternic polimerizat fiind combinat cu proteine într'un complex destul de stabil.

Un fapt extrem de interesant este că acidul desoxiribonucleic extras dintr'o celulă bacteriană fără a fi însă depolimerizat s'a dovedit a fi capabil să provoace transformarea unei bacterii de un anumit tip într'o bacterie de un tip analog aceleia din care a fost extras. S'a reușit astfel să se realizeze transformarea unui pneumococ de tip „R" într'un pneumococ de tip „S" prin acțiunea acidului desoxiribonucleic extras din pneumococul tip „S". Această transformare se poate realiza chiar cu o cantitate de 1/600 000 000 acid desoxiribonucleic. Acelaș fenomen s'a constatat la colibacili (Boivin) și indică importanța acidului desoxiribonucleic în transformarea tipului microbian. Starea arhitectonică intactă a acidului nucleic este însă un factor important. S'a constatat într'adevăr că prin depolimerizare, sub acțiunea desoxiribonucleazei, își pierde această proprietate de a induce transformarea de tip A. N. Belozerschi deduce dintr'o serie de date experimentale că acidul desoxiribonucleic ar constitui un factor de bază în determinarea tipului și compoziției proteinei caracteristice unei specii. Intrând în strânsă combinare cu aceasta și izolând-o din sfera reacțiilor active, acidul desoxiribonucleic ar fi suportul caracterelor de specie. Este probabil că există un număr foarte mare de acizi desoxiribonucleici diferiți, care ar explica enorma diversitate a tipurilor bacteriene.

2. **Acidul ribonucleic** se găsește în citoplasma celulei bacteriene. Bogăția în acid ribonucleic este în funcție de starea fiziologică a celulei și este cu atât mai mare, cu cât activitatea fiziologică a celulei este mai intensă, respectiv cu cât procesul de sinteză al proteinelor este mai intens. Conținutul în acid ribonucleic al bacteriei atinge valoarea maximă în faza de latență a ciclului de creștere, deci în perioada în care sintezele bacteriene sunt cel mai intense. Conținutul excepțional de mare al bacteriilor în acid ribonucleic citoplasmic indică o mare capacitate de

Scanned with OKEN Scanner

sinteză a proteinelor, legată la rândul ei de o extrem de mare capacitate de multiplicare a acesteia.

Se atribue acidului ribonucleic un rol important în transmiterea caracterelor câştigate, în special în ceeace priveşte echipamentul enzimatic. O experienţă interesantă, care evidenţiază acest rol, este următoarea:

O levură care nu degradează în mod obişnuit galactoza poate deveni capabilă să o degradeze dacă este cultivată în mediu cu galactoză; se produce probabil o transformare enzimatică prin adaptare la un mediu adecvat. Dacă din levura adaptată se scoate acidul nucleic şi se adaugă unei levuri încă neadaptate, aceasta devine imediat capabilă să degradeze galactoza.

Experienţa cu ^{32}P pune în evidenţă participarea acidului ribonucleic în condiţiile de multiplicare, respectiv de sinteză a celulei.

Constituenţii glucidici ai celulei bacteriene

Conţinutul în glucide al bacteriilor variază între 12—28% din greutatea substanţei uscate. Aceste glucide există sub forme diferite şi sub grade de complexitate diferite şi pot fi sintetizate de celula bacteriană din componente simple (alcooli, pentoze, hexoze, acizi glicuronici, etc.). Glucidele se găsesc aci sub formă de oze simple sau aminate, sub formă de polizaharide, celuloză, amidon, glicogen, pentozane şi sub formă de heterozide (acetilpolizaharide, lipidopolizaharide, lipidopeptidopolizaharide, acizi aldobionici, etc.).

Pentozane s'ar găsi la *Mycobacterium tuberculosis*, *Corynebacterium diphteriae*.

Hexozane se găsesc la toate bacteriile. Dextranul, un hexozan folosit ca înlocuitor de sânge, este sintetizat sub formă pură de o bacterie (*Leuconostoc mesenteroides*).

Celuloza se găseşte rar la bacterii şi în cantităţi foarte variabile (*Acetobacter xylinum*).

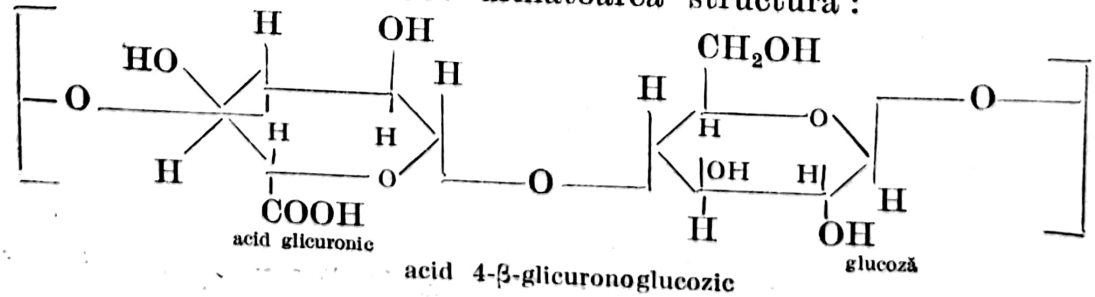
Polizaharide antigenice. Cercetările din ultimii ani au arătat prezenţa în celula bacteriană a unor polizaharide complexe. Aceste polizaharide sunt în general combinate cu componente neglucidice şi eonferă celulei bacteriene caracterul său specific; izolate din celula bacteriană au caracter antigenic.

Primele polizaharide cu caracter antigenic au fost izolate din pneumococi (Heidelberger şi Mery) şi s'au dovedit, a fi diferite, din punct de vedere chimic, pentru fiecare tip de pneumococ.

Astfel, din pneumococul tip I s'a izolat un polizaharid care conţine 4,8% azot sub formă de azot aminic. Prin hidroliză se separă un zahăr aminat şi acid galacturonic.

Din pneumococul tip II s'a izolat un polizaharid lipsit de azot, care prin hidroliză se dedublează în glucoză şi acid glicuronic.

Polizaharidul extras din penumococul tip III este un acid polialdobionic, în care unitatea are următoarea structură:



acid 4-β-glicuronoglucozic

Polizaharidul extras din pneumococul tip IV conține 5% N și prin hidroliză scindează un zahăr aminat, glucoză și acid acetic; este un acetil-polizaharid.

Polizaharide specifice au fost extrase din aproape toate bacteriile (coli, tific, vibrion holeric, b. difteric, etc.) și sunt localizate fie în capsulele celulei bacteriene ca la pneumococi, fie în corpul celular, ca la majoritatea celorlalți germeni.

Din *B. anthracis* s'a extras un polizaharid cuplat cu un polipeptid al acidului glutamic.

Polizaharidele bacteriene sunt componente extrem de importante, deoarece ele conferă caracterul de specificitate diverselor tipuri de germeni. Natura și conținutul în aceste polizaharide variază însă extrem de mult cu o serie de factori, dintre care tipul microbian este foarte important.

Polizaharidele au caracter de haptenă. Vom vedea în capitolul următor rolul polizaharidelor în procesele de imunitate.

Sinteza și degradarea glucidelor de către microorganisme se fac probabil pe aceeași cale ca și în celula animală (țesutul muscular), deoarece ele posedă un echipament enzimatic aproape identic cu al acestor celule. Unele microorganisme pot însă utiliza anumite căi proprii de degradare.

Degradarea glucidelor pe calea fosforilării a fost pusă în evidență la o serie de bacterii și se pare că această cale de degradare e comună majorității organismelor unicelulare, precum și celulei animalelor superioare, dar nu reprezintă singura cale posibilă.

Unele microorganisme pot oxida direct glucidele, fără o prealabilă fosforilare. Glucozo-oxidaza poate oxida glucoza în acid gluconic și este capabilă de a transporta direct hidrogenul substratului pe oxigenul molecular, fără intervenția sistemului citocromic. Se formează apă oxigenată, care, fiind toxică, este degradată de către catalază, enzimă prezentă în foarte multe bacterii.

Reacția de oxidare sub acțiunea acestei enzime ar fi astfel cuplată cu oxidarea altor substanțe de către oxigenul desfăcut din H_2O_2 sub acțiunea catalazei, conform schemei:

$$\left.\begin{matrix}\text{Glucoză}\\+\\O_2\end{matrix}\right\} \xrightarrow{\text{Glucozo-oxidază}} \left\{\begin{matrix}\text{Acid}\\\text{gluconic}\\+\\H_2O_2\end{matrix}\right. \xrightarrow[\text{Catalaza}]{C_2H_5OH} \left\{\begin{matrix}\text{Acid}\\\text{gluconic}\\+\\2H_2O\\+\\CH_3CHO\end{matrix}\right.$$

Acidul piruvic care constitue o componentă cheie, rezultantă a diverselor metabolisme (glucidic, proteic, lipidic), poate fi degradat diferit, potrivit cu organismul și cu tipul de respirație. Metabolismul celular al acestei componente nu este complect cunoscut. Se știe că carboxilaza (difosfotamina) are un rol important în decarboxilarea anaerobă a acidului piruvic în acid acetic și CO_2. La bacterii, se poate ca această decarboxilare să fie precedată de o fosforilare, cu formarea unui acetil-fosfat, compus intermediar labil, având o legătură fosfat puternic energetică. Acest tip de scindare poartă numele de scindare fosforoclastică și are diverse aspecte în raport cu specia bacteriană și condițiile exterioare. In toate cazurile se formează acetilfosfatul, care poate fi transformat în acid acetic sau poate să se condenseze direct cu alți compuși de carbon cu formare de compuși cu 4—5 atomi de carbon.

Se cunosc trei tipuri de scindare fosforoclastică a acidului piruvic la bacterii. Ele sunt redate în ecuațiile următoare:

$$O_2 \rightarrow CH_3COO(P_3) + 2H + CO_2 \quad \text{(Lactobacillus delbrueckii)}$$

$$CH_3-CO-COOH + H_3PO_4 \rightleftarrows CH_3COO(P_3) + H_2 + CO_2 \quad \text{(Clostridium acetobutyricum)}$$

$$CH_3-COO(P_3) + H\,COOH \quad \text{(Escherichia coli)}$$

$$\searrow$$

$$H_2 + CO_2$$

Transformarea acidului piruvic în acid acetic și CO_2 de către *Lactobacillus delbrueckii* necesită prezența oxigenului și fosfaților; celelalte microorganisme realizează această transformare în condiții anaerobe. *B. coli* formează intermediar acidul formic (H COOH), care este descompus ulterior sub acțiunea enzimei hidrogenliaza în CO_2 și H_2. Acetilfosfatul conține o legătură fosfat puternic energetică, care poate fi transferată pe acidul adenozindifosforic, astfel că energia eliberată în această reacție endergonică de decarboxilare poate fi folosită în alte reacții endergonice. Ultimele două reacții sunt reversibile și acidul piruvic poate fi sintetizat din acid acetic și CO_2, energia necesară fiind dată de acidul adenozintrifosforic.

O asemenea reacție a fost pusă în evidență în extractele acelulare ale bacilului coli.

Reacția descrisă este foarte importantă, deoarece energia eliberată aci poate fi folosită pentru sinteza unei noi protoplasme celulare, acidul piruvic putând fi punctul de plecare în sinteza glucidelor, lipidelor, proteinelor. Microorganismele nu pot să se desvolte în absența complectă a CO_2, aceasta probabil datorită necesității acestei componente în sinteza diverșilor constituenți. Intr'adevăr, s'a constatat că piruvatul se poate combina cu CO_2 pentru a forma acidul oxaloacetic (reacția Wood și Werkmann);

$$CH_3CO\,COOH + CO_2 \rightleftarrows COOH\,CH_2CO\,\,COOH$$

componentă care am văzut că poate constitui deasemenea un punct de întâlnire al diverselor metabolisme.

S'a găsit la bacterii o enzimă, oxaloaceticdecarboxilaza, care catalizează reversibil această reacție, fixarea CO_2 fiind astfel un proces reversibil. Enzima necesită prezența Mg sau Mn și se pare că la unele microorganisme biotina ar fi și ea implicată în această reacție.

Fixarea CO_2 la acidul oxaloacetic este un proces endergonic, energia fiind dată de ATF.

Sinteza glucidelor la microorganisme nu se cunoaște încă cu precizie. Etapele de degradare a glucidelor până la formarea anaerobă a acidului piruvic fiind perfect reversibile, aceleași sisteme enzimatice vor putea realiza sintezele respective. In procesul de sinteză, glucozo-6-fosfatul, sub acțiunea fosfoglucomutazei, va fi transformat în glucozo-1-fosfat care, sub influența fosforilazei, va realiza polimerizarea la polizaharoid.

Piruvat $\rightleftarrows$ glucozo-6-fosfat $\rightleftarrows$ glucozo-1-fosfat

fosfo gluco mutaza

$\downarrow$ fosforilaza

Polizaharid + PO_4H_3

Recent s'a demonstrat că sinteza zaharozei de către *Pseudomonas sacharofila* are loc pe această cale

$$\text{Glucozo}-1-\text{fosfat} \xrightleftharpoons{+PO\,H_3} \text{glucozo}-1-\text{fructozid (zaharoza)}$$

$$+ \qquad\qquad \downarrow$$

$$\text{fructoză} \qquad\qquad \text{fosforilaza}$$

Lipidele microorganismelor

Lipidele bacteriene aparțin clasei lipidelor neutre, fosfolipidelor și cerurilor. Conținutul în aceste lipide variază extrem de mult pentru diversele specii bacteriene. Limitele ar fi, pentru substanțele extractibile în eter, între 1,56 și 40,8% din greutatea corpilor microbieni uscați.

Producerea de lipide speciale sau ceruri caracterizează speciile bacteriene diverse și conținutul lor variază pentru același germen cu o serie de condiții: mediul de cultură, vârsta culturii, tipul microbian, etc.

Mycobacterium tuberculosis hominis			are	27,7%	lipide	totale
„	„	*bovis*	„	22,3%	„	„
„	„	*avium*	„	11,0%	„	„
„	„	B C G	„	25,4%	„	„
Corynebacterium diphteriae			„	4,9%	„	„
Escherichia coli			„	7,8%	„	„
Salmonella typhi murium			„	4,9%	„	„
Staphylococcus albus			„	2,8%	„	„

Acizii grași prezenți în fracțiunea acetonosolubilă a bacilului tuberculos sunt formați din acid palmitic în mare cantitate, acid stearic în cantitate mică, mici cantități de acid linoleic și linolenic, acid tuberculostearic ($C_1\,H_{3s}O_2$) și acid ftioic ($C_{26}H_{52}O$) în cantitate mare. Acidul ftioic extras din bacilul tuberculos la animale produce, la locul de inoculare, leziuni specifice. De semnalat că grăsimile neutre din bacilul tuberculos uman există sub formă de esteri ai acizilor grași cu trehaloza și nu cu glicerolul. Din lipoizii bacilului tuberculos s'au extras glucidolipide de tipul cerebrozidelor care liberează prin hidroliză glucoză, manoză, arabinoză.

Fosfatidele au fost puse în evidență la bacterii. Germenii neacidorezistenți ar avea valori cuprinse între 0,2—2% substanță uscată, cei acidorezistenți între 0,6—6,5%.

Prezența *sterolilor* la bacterii nu a fost pusă până acum în evidență.

Ceridele sau cerurile există în cantități mici în germenii neacidorezistenți (de exemplu, 0,3% la *Corynebacterium diphteriae*) și în cantități importante la germenii acidorezistenți (*B. tuberculosis*). La acești germeni compoziția cerurilor a fost studiată în amănunt (Anderson). Ele sunt formate în special din hidroxiacizi de greutate moleculară mare, acizi micolici, combinați cu glucide simple sau polizaharide; mai conțin acizi grași cu moleculă mică și alcooli cu moleculă mare. Hidroxiacizii (acizii micolici) sunt diferiți pentru diversele tipuri de bacili tuberculoși și sunt saturați și nesaturați, dextrogiri și acidorezistenți. Este de notat că diver-

sele tipuri componente lipidice din bacilii tuberculoşi variază dela un tip de germen la altul. R. J. Anderson dă următoarele valori : (vezi tabelul 81).

Tabelul 81

	B. tuberculos uman	B. tuberculos bovin	B. tuberculos aviar
Fosfolipide	6,54 %	1,53 %	2,26 %
Lipide acetonosolubile	6,20 %	3,34 %	2,19 %
Ceride (sol. în cloroform)	11,03 %	8,52 %	10,79 %
Lipide totale	23,78 %	13,40 %	15,26 %

Din *Mycobacterium leprae* s'a izolat un alcool optic activ, β-octodecanolul ($C_{18}H_{35}OH$) şi β-cicosanolul ($C_{20}H_{39}OH$), esteri ai acizilor graşi cu trehaloza. Din ceara acestui germen (leprozina) s'a izolat acid miristic, palmitic, stearic, tetracosanic şi un hidroxiacid, acidul leprozinic ($C_{44}H_{88}O_3$).

Complexe glucido-lipido-polipeptidice au fost izolate din majoritatea bacteriilor Gram negative şi ar reprezenta, la aceste microorganisme, endotoxina. Aceste complexe pot funcţiona ca antigene complecte. Prin hidroliză în mediu slab acid, componenta lipidică poate fi desfăcută de componenta glucidică.

Metabolismul grăsimilor la microorganisme este puţin cunoscut. Sinteza lipidelor depinde de compoziţia mediului şi este mult crescută în prezenţa acetaţilor. Bacterii cultivate pe mediu cu acetat având încorporat carbon izotop au pus în evidenţă transformarea acestora în acid butiric şi caproic.

Pigmenţii microorganismelor

Multe bacterii sunt producătoare de pigmenţi ; aceştia pot fi intra- şi extracelulari. Pigmentul este în funcţie de o serie de factori, şi anume : pH-ul, prezenţa oxigenului, temperatura, aportul de azot.

Piocianina este pigmentul produs de *Pseudomonas aeruginosa.*

Prodigiozina este pigmentul roşu produs de *Bacillus prodigiosus* (*Serratia marcescens*). O serie de carotenoide au fost extrase din bacterii (purpurobacterii).

Enzimele bacteriene

Complexul enzimatic al bacteriilor este foarte bogat şi activ. Enzimele din acest complex sunt aceleaşi pe care le-am întâlnit la organismele superioare, astfel că nu mai revenim asupra enunţării şi descrierii lor. Trebue amintite însă enzimele elaborate de celula bacteriană şi care au acţiune toxică şi constitue adevărate toxine bacteriene, ca de exemplu *fibrinolizina*, enzimă proteolitică din streptococul hemolitic, capabilă de a degrada fibrina ; *leucocidina* din diverse specii bacteriene care acţionează asupra leucocitelor şi le distruge ; *hialuronidaza* elaborată de diverse bacterii (streptococ, pneumococ, stafilococ, *Clostidrium welchii*), care prin depolimerizarea acidului hialuronic constituent al ţesutului conjunctiv — favorizează invazia bacteriană ; *lecitinaza* din *Clostidrium welchii*, care ar fi identică cu α-toxina letală, hemolitică şi necrotică din filtratele cultu-

Scanned with OKEN Scanner

rilor și care hidrolizează lecitina, componentă importantă a membranei celulare; *penicilinaza*, care este elaborată de o serie de bacterii (coli, b. Shiga) și împiedică astfel acțiunea antibiotică a penicilinei asupra acestor germeni.

La bacterii se mai cunosc o serie de enzime neîntâlnite la alte organisme. De exemplu, *hidrogenaza*, care catalizează reducerea diverselor substanțe de către hidrogenul molecular [b. coli bacteriile producătoare de metan (*Hydrogenomonas*)].

Enzime constitutive și enzime adaptative. *Diauxia.* După Karström, enzimele se pot grupa, în enzime *constitutive* și *adaptative* sau *adoptive.*

Enzimele constitutive sunt enzimele independente de prezența substratului specific în sistem.

Enzimele adaptative sunt formate numai după stimularea exercitată de prezența unui anumit substrat în sistem, ca un răspuns specific la prezența substratului corespunzător sau a produselor lui de descompunere.

Enzimele adaptative sunt strict specifice în raport cu substratul care a provocat apariția enzimei respective. Producerea de galactoză de către levură este exemplul cel mai cunoscut. Se cunosc o serie de cazuri analoage, în special la bacterii. Se credea inițial că apariția enzimelor adaptative ar fi datorită unei selecții, dar cercetări ulterioare au arătat că acest lucru nu este exact, deoarece el se petrece și în absența creșterii celulelor. Este vorba de fapt de o adaptare printr'o modificare a metabolismului celular. S'a constatat astfel că, în cazul levurei, formarea enzimelor adaptative este întovărășită de o descreștere a P nucleoproteidic, respectiv a acidului ribonucleic; agenții care împiedică această descreștere (azida de sodiu) împiedică și formarea enzimei adaptative.

Formarea enzimei poate fi provocată și de prezența produselor de degradare ale substratului. Astfel, formarea de invertază în levură este realizată de glucoză și de zaharoză.

Producerea de enzimă de tip adaptativ nu se transmite ereditar, ci dispare când celula este crescută în absența substratului. După unii autori, prezența substratului în sistem nu creează o nouă enzimă, ci prezența substratului sau a produselor lui de scindare stimulează activitatea enzimei existente în prealabil în celulă; substratul adăugat se combină cu enzima, echilibrul se deplasează în sensul unei stimulări a formării de noi cantități de enzimă. După această concepție, în celulele normale există cantități minime din toate enzimele, însă foarte puține sunt în fiecare moment active, deoarece enzima activă nu apare dintrodată ca atare; este de presupus că echilibrul este atins lent.

După Monod, substratul acționează modificând formarea enzimei normale. Potrivit cu această teorie, enzimele normale sunt continuu formate din precursorii lor în celulă, printr'o reacție autocatalitică. Când se adaugă un nou substrat sau alt compus care se combină cu enzima, acesta poate acționa ca o coenzimă. Mersul reacției se schimbă astfel încât o enzimă foarte puțin diferită este formată alături de enzima obișnuită; când substratul nu mai este prezent, enzima rămâne la nivelul normal. Monod a studiat un fenomen enzimatic spiral căruia i-a dat numele de *diauxie* caracterizată prin apariția a două maxime succesive de creștere ale unei populații bacteriene, maxime separate printr'o fază de activitate nulă. Diauxia este în legătură cu degradarea enzimatică

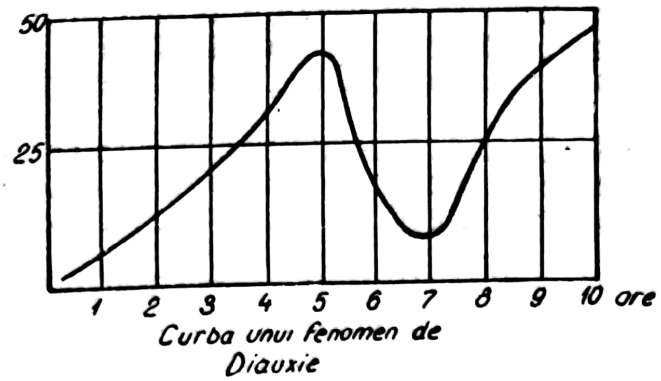


Fig. 179. Curba unui fenomen de diauxie

a glucidelor din mediul de cultură. Dacă într'un mediu de cultură există două zaharuri, de exemplu glucoza şi fructoza, al doilea glucid nu va fi atacat decât atunci când primul glucid a fost complect asimilat. Cele două maxime de creştere corespund variaţiei activităţii enzimatice în cursul creşterii (fig. 179).

RESPIRAŢIA BACTERIANĂ

Respiraţia, adică procesul prin care celula obţine energia necesară creşterii, poate fi de tip *aerob* şi *anaerob*, dacă se ia în considerare valoarea potenţialului de oxidoreducere al sistemului. Reacţiile de oxidare care se produc continuu în celulă, reprezintă una din sursele energetice cele mai importante.

In respiraţia aerobă, oxidarea substratului se face în prezenţa oxigenului molecular. Toate bacteriile aerobe conţin echipamentul enzimatic care labilizează oxigenul molecular, şi anume citocromii şi citocromoxidaza.

In respiraţia anaerobă, oxidarea substratului se face pe seama oxigenului din molecule prin procese de dehidrogenări succesive, prin intervenţia sistemelor dehidrazice şi a fermentului galben, etc. Mecanismul este însă acelaş şi dirijat de nivelul potenţialului de oxidoreducere al diverselor sisteme.

Metodele prin care se poate studia respiraţia bacteriilor.

Metodele chimice sunt bazate pe dozarea O_2 sau CO_2 disolvat în suspensia microbiană sau pe analiza gazelor din atmosfera care se află în echilibru cu suspensia microbiană. *Metodele fizico-chimice* sunt bazate pe variaţiile de pH, datorite eliberării de CO_2. *Metodele fizice* sunt metode manometrice bazate pe variaţia de presiune datorită absorbţiei de oxigen consumat de către celula care respiră. In această metodă se foloseşte aparatul Warburg, care face posibilă determinarea în timp a evoluţiei respiraţiei. Respiraţia bacteriilor prezintă variaţii în funcţie de vârsta culturilor, de mediul de creştere, de specia şi tipul microbian. Microbii au o intensitate respiratorie foarte mare. Astfel, *B. subtilis* are o respiraţie de 350 mm^3 (raportat la 1 g corpi uscaţi), ceeace corespunde unui număr de calorii de 350 de ori mai mare decât al omului (la o greutate comparabilă).

Coeficientul respirator al unor bacterii este dat în tabelul 82.

Tabelul 82

	Mediu agar-glicerol	Mediu glucoză
Mycobacterium tuberculosis hominis.	0,856	0,992
„ „ bovis.	0,903	1,036
Corynebacterium diphteriae.	0,802	0,906

Scanned with OKEN Scanner

Din punctul de vedere al respiraţiei, germenii au fost împărţiţi în aerobi şi anaerobi stricţi şi aerobi şi anaerobi facultativi. Lămurirea proceselor de oxidoreducere şi noţiunea de potenţial de oxidoreducere a pus însă în evidenţă faptul că această divizare este formală şi că diferenţele dintre germenii aparţinând acestor grupe sunt corelate numai cu nivelul potenţialului lor de oxidoreducere, respectiv cu capacitatea de a reduce oxigenul liber sau oxigenul din diversele compone te.

Respiraţia anaerboă se poate urmări în vid în tuburile Thünberg prin determinarea timpului de decolorare a albastrului de metilen de către suspensia microbiană. Cu această metodă se poate determina activitatea dehidrogenazică în raport cu diversele substraturi, albastrul de metilen funcţionând ca acceptor al hidrogenului din substrat, labilizat de către dehidraza specifică. Albastrul de metilen, fixând hidrogenul, se transformă în albastru de metilen incolor (leuco). Timpul de decolorare este invers proporţinal cu activitatea dehidrogenazică.

NECESITĂŢILE NUTRITIVE ALE BACTERIILOR

Bacteriile necesită o cantitate de substanţe alimentare foarte mare în raport cu dimensiunile lor (o bacterie consumă o cantitate egală cu greutatea ei), fapt care-şi găseşte explicaţia în multiplicarea extrem de intensă a acestor microorganisme. Există o foarte mare varietate în ceeace priveşte necesităţile nutritive. Din acest punct de vedere, bacteriile se pot diviza în două grupe mari: 1) *bacteriile autotrofe* şi 2) *bacteriile heterotrofe*.

1. **Bacteriile autotrofe** pot obţine atât C, cât şi N necesar sintezelor proprii din surse anorganice, respectiv din CO_2, carbonaţi, din N atmosferic, NH_3. Ele pot lua energia necesară sintezelor din reacţii chimice şi atunci poartă numele de bacterii chimiosintetizante, sau din energia solară, bacterii fotosintetizante. In primul caz, energia necesară sintezelor este luată din oxidarea diverselor substanţe chimice pe care organismul este capabil să le oxideze; există astfel:

a) *autotrofe care oxidează compuşii azotaţi*. Bacteriile nitroase au proprietatea de a transforma sărurile amoniacale în nitriţi (genul *Nitrosomonas* şi *Nitrosococcus*) $2NH_3 + 2\,O_2 \rightarrow 2\,NO_2H + 2\,H_2$. Hidrogenul liberat în oxidarea amonicului $2H_2 + CO_2 \rightarrow H-C\begin{matrix}/\!/O\\ \backslash H\end{matrix} + H_2O$ este folosit în sinteza formaldehidei care prin polimerizare ştim că duce la glucoză.

B a c t e r i i l e n i t r i c e (genul Nitrobacteriilor) oxidează nitriţii în nitraţi $NO_2H + O \rightarrow NO_3H + 21{,}6$ cal. Nitraţii se ştie că sunt utilizaţi de plantele verzi ca sursă de azot, pentru sinteza clorofiliană, şi azotul intră astfel în combinaţiile organice, închizând ciclul azotului în natură.

b) *autotrofele care oxidează sulful* (de tipul *Triobacillus thiooxidans*) transformă sulfurile în sulf şi sulfaţi, din care plantele sintetizează tioaminoacizii din proteine, şi astfel se reformează ciclul sulfului în natură.

Un grup de bacterii ca *Beggiotoa alba* şi *Thiotrix* conţin numeroase globule de sulf. Ele nu se pot desvolta decât în prezenţa H_2S; când acesta este absent, îşi utilizează sulful propriu.

c) *Ferobacteriile* utilizează CO Fe cu formare de hidroxid de fier coloidal [$Fe_2(OH)$] care este excretat și se depune înlocuind suprafața filamentului bacterian.

d) *Hidrogenomaxele* sunt capabile de a oxida, cu producere de apă, gazul hidrogen, produs de bacteriile heterotrofe în cursul fermentației glucidelor.

Bacteriile fotosintetizante folosesc energia solară pentru sinteza diverselor substanțe organice. Acestea conțin un pigment verde, bacterioclorofila, care poate fi mascat adesea de prezența altor pigmenți de tipul carotenoidelor. Aceste bacterii au nevoie de lumina solară; se deosebesc de plante prin aceea că nu pot trăi decât în anaerobioză. Sunt strict anaerobe, folosesc astfel ca acceptor de oxigen o altă componentă din mediu, de exemplu sulful, formând H_2S sau însuși hidrogenul. Bacteriile acestea sunt răspândite în sol sau ape (Rhodotiobacteriile), conțin concrețiuni formate din globule de sulf. Sinteza s'ar face astfel:

$$CO_2 + H_2S \rightarrow H - C\begin{matrix} \diagup H \\ \diagdown\!\!\diagdown O \end{matrix} + 2\,S$$

din formaldehidă prin polimerizare se sintetizează ulterior glucoza.

2. **Bacteriile heterotrofe** nu se pot desvolta decât din substanțele organice preformate; în această grupă intră majoritatea bacteriilor patogene, prin adaptare la parazitism, puterea de sinteză, respectiv echipamentul lor enzimatic este simplificat, această simplificare variind mult dela o bacterie la alta; astfel grupa B. coli poate utiliza ca sursă de C o substanță organică mai simplă (de exemplu glucoza) și ca sursă de N sărurile de amoniu. Alte bacterii prezintă o heterotrofie mai exigentă cerând chiar în mediu prezența unor componente chimice speciale mai complicate, cum sunt aminoacizii, sau factori de creștere speciali. Intre bacteriile autotrofe și heterotrofe, se găsesc o serie de bacterii, așa numitele *bacterii prototrofe* care pot folosi azotul din surse de carbon. (De exemplu Azotobacterii, Rhizobicem).

SUBSTANȚELE DE CREȘTERE

Creșterea bacteriilor depinde de o serie de procese chimice care constitue metabolismul lor esențial pentru realizarea căruia bacteriile au nevoie de anumite componente în mediul de cultură, natura acestor componente fiind în funcție de echipamentul enzimatic al acestora. Metabolismul esențial al bacteriilor este în general acelaș, diferențele constau în capacitatea acestor organisme de a realiza transformările care să creeze metabolitele esențiale necesare. Unele bacterii pot să-și sintetizeze singure metabolitele esențiale, altele necesită aportul exterior; acesta devine astfel un aliment esențial, un *factor de creștere*. „Factorul de creștere" este astfel un „metabolit esențial" pe care organismul nu-l poate sintetiza.

Această capacitate de sinteză poate însă să se modifice sub acțiunea factorilor exteriori prin procese de adaptare. In general factorii de creștere au rol de coenzime ale sistemelor enzimatice. Vom vorbi de metabolitele esențiale mai importante.

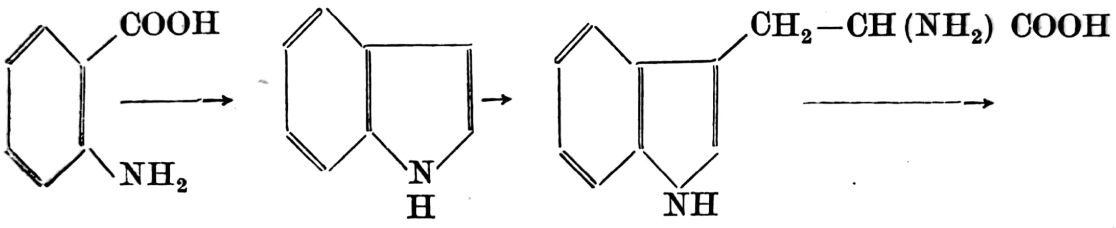
Hematina. O mică grupă de organisme au pierdut capacitatea de a sintetiza hemul (din molecula hemoenzimelor) din fier; astfel Hemophilus

influenzae nu poate crește în mediu cu peptonă fără aportul a 2 factori adiționali (care există în sânge): *factorul X* (termostabil) și *factorul V* (termolabil).

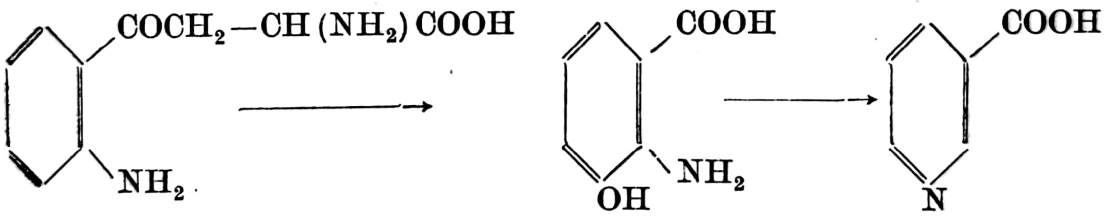
Factorul X este o parte din pigmentul sanguin și poate fi înlocuit printr'un amestec de fier și protoporfirină; germenele înseamnă că nu poate sintetiza protoporfirina.

Factorul V este factorul termolabil care se găsește în extractele tisulare, a fost identificat cu coenzima I.

Acidul nicotinic poate fi un factor de creștere pentru diversele organisme, dar diversele specii diferă în capacitatea lor de a transforma acidul nicotinic în nicotinamidă și deci de a utiliza acidul nicotinic în loc de nicotinamide. Aceste componente sunt necesare sintezei coenzimelor I și II care intervin în metabolisme diverse fiind componente ale dehidrogenazelor. Nu se știe exact calea prin care este sintetizat acidul nicotinic de organismele care nu necesită aport exterior; această substanță ar putea proveni din acidul antranilic pe calea indolului și triptofanului.



acid antranilic — Indol — Triptofan

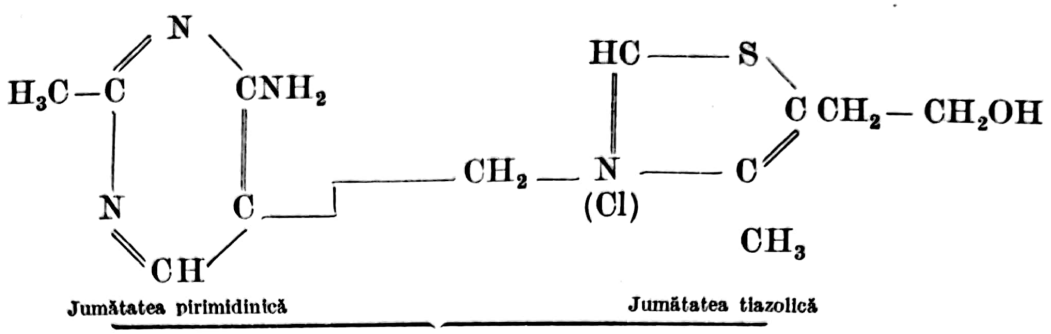


chinurenina — acidul hidroxiantranilic — acidul nicotinic

Actenina constitue pentru unele organisme un factor de creștere, ea este componenta multor enzime, de exemplu a flavinenzimelor, a acizilor adenilici cu rol fundamental în transferul de energie, intră în structura nucleoproteinelor.

Tiamina (Vitamina B_1) este un metabolit esențial pentru bacterii, fungi, plante, animale. Din acest punct de vedere bacteriile au fost divizate în 4 grupe.

1. Acelea care sintetizează tiamina din constituanți mai simpli din mediu.
2. Acelea care sintetizează tiamina numai prin aportul uneia din jumătățile moleculei sale, jumătatea pirimidinică sau cea tiazolică.
3. Acelea care nu o pot sintetiza decât prin aportul ambelor jumătăți (Staph. aureus).
4. Acelea care nu o pot sintetiza chiar dacă există aportul celor 2 jumătăți ale moleculelor (Streptoccocus salivarius).



Tiamina

Aceste 4 grupe reprezintă stagii succesive ale pierderii capacității de sinteză datorită unei adaptări la viața parazitară.

Riboflavina este un metabolit esențial (coenzima fermentului galben) pentru o serie de microorganisme care au pierdut capacitatea în timpul vieții parazitare de a sintetiza (streptococii hemolitici). Necesitatea nutritivă a riboflavinei este în funcție de mediu.

Piridoxina (Vitamina B) este esențială pentru o serie de bacterii (stafil. albus, Leuconostoc mesenteroides).

Piridoxalul am văzut că este coenzima transaminazelor, a decarboxilazelor.

Acidul pantotenic este un factor de creștere necesar tulpinelor de Corynebacterium diphteriae, Lactobacillus casei. Ar fi implicat în metabolismul acidului piruvic. Ar fi necesar la sinteza triptofanului la Staph. aureus.

Biotina este sintetizată de unele bacterii Mycobac. tuberculozis, Escherichia Coli, Bacillus anthracis, dar nu de altele (streptococi, stafilococi, pneumococi).

Acidul p. aminobenzoic (P A B A) este necesar unora din bacterii, dar majoritatea îl pot sintetiza; are rol în sinteza acidului folic (acid pteroilglutamic).

Acidul pimelic ($COOH-CH_2-(CH_2)-COOH$) este un factor de creștere pentru unele tulpini de Corynebacterium dipthteriae.

Acidul folic nu poate fi sintetizat de unele microorganisme.

Substanțele acționează probabil ca factori de creștere fiind componente ale unor sisteme enzimatice importante. Dar nu numai coenzimele sau grupările prostetice pot funcționa în acest fel. Orice moleculă organică sau anorganică poate fi un metabolit esențial, o substanță de creștere, dacă organismul nu o putea sintetiza.

Partea II

BIOCHIMIA VIRUSURILOR

Virusurile sau inframicrobii sunt agenți infecțioși caracterizați prin dimensiunea lor mică și capacitatea de a se reproduce numai în interiorul celulei vii. Nu s'a reușit până acum creșterea virusurilor pe medii artificiale. Descoperirea agenților infecțioși de natură virotică este datorită cercetătorului rus, D. I. Ivanovschi (1892).

Forma și dimensiunea diferitelor virusuri variază foarte mult. Astfel virusul Poliomielitei apare a fi esențialmente sferic cu diametrul de 25 milimicroni, pe când virusul *mozaicul tabacului* s'ar prezenta sub formă

de bastonașe lungi de 15 × 280 milimicroni. Corpusculul elementar al vaccinei pare a fi rectangular cu o lungime și lățime de aproximativ 260 × 210 milimicroni. Virusul poliedrei viermelui de mătase este sferic cu diametrul de 10 milimicroni. Virusul bacteriilor, bacteriofagul, are aspectul unui spermatozoid având o extremitate rotunjită și un apendice terminal, lungimea totală a bacteriofagului fiind de 250—400 milimicroni.

Virusurile ar ocupa un loc intermediar între mărimea moleculară a proteinelor și organismelor vii. Utilizarea ultracentrifugei și în special a microscopului electronic au permis o determinare mai exactă a dimensiunilor și greutății moleculare a virusurilor. Cu ajutorul microscopului electronic s'a putut realiza materialitatea vizuală a virusurilor. Virusurile se pot cultiva pe embrionul de găină în desvoltare sau în țesutul tumoral.

Studiul metabolismului virusurilor indică absența unui metabolism autonom la aceste microorganisme. Activitatea vitală a virusurilor este complect dependentă de activitatea vitală a celulei-gazdă, ceeace explică dece virusurile nu se pot desvolta decât în interiorul celulei sau în culturi de țesuturi. Inmulțirea virusurilor este legată de procesele de metabolism ale acestor celule. Nu s'a putut pune în evidență până acum existența unui echipament enzimatic, care să catalizeze reacțiile metabolice și care să facă posibil un metabolism autonom la aceste microorganisme. Deasemenea nu s'a putut pune în evidență până acum existența respirației la virusuri.

PROPRIETĂȚILE FIZICO-CHIMICE ALE VIRUSURILOR

Izolarea, purificarea și concentrarea virusurilor se bazează pe o serie de proprietăți fizico-chimice ale acestora, și a permis studiul lor mai amănunțit. Virusurile sunt cristalizabile, astfel o serie de virusuri, în special virusurile din plante au fost obținute sub formă cristalizată, primul obținut sub această formă fiind virusul mozaicul tabacului (Stanley 1935). Cristalele sunt alungite cu aspect circular. Studiul cu raze X, indică o structură fibrilară. *Virusurile sunt ultrafiltrabile.* Prin filtrare prin ultrafiltre de colodiu de porozitate cunoscută, s'au putut determina dimensiunile acestora.

Virusurile de formă alungită prezintă fenomenul dublei refracții de scurgere. Studiul electroforetic al virusurilor indică existența unei încărcări electrice în funcție de pH-ul mediului. Punctul izoelectric al virusului vaccinei ar fi după unii autori 4,5, după alții 5,30, a poliedrei viermelui de mătase 5,6—6. Virusul gripal 4,8—5. (V. I. Tovarnițki). Mozaicul tabacului 3,5—8. Pentru purificarea virusurilor s'a folosit precipitarea lor la punctul izoelectric.

Virusurile pot fi sedimentale sub acțiunea câmpurilor centrifugale cuprinse între 50.000—100.000 de ori acel al gravitației. Prin centrifugare diferențială s'a reușit purificarea acestora. Electroforeza deasemenea a fost folosită pentru purificarea virusurilor (Aparatul Tiselius).

COMPOZIȚIA CHIMICĂ A VIRUSURILOR

Studiul chimic al virusurilor a fost făcut pe preparatele purificate ale acestora. Se pare că există o compoziție caracteristică pentru un virus dat, dar o mare variabilitate pentru diversele virusuri. Virusurile

Scanned with OKEN Scanner

în general sunt compuse din *acizi nucleici*, *proteine*, adesea *lipide* cu *glucide*. *Acizii nucleici şi proteinele există în absolut toate varietăţile de virusuri* (vezi tabelul 83). Virusul influenţei ar conţine o polizaharidă în compoziţia căreia intră manoza, galactoza şi glucozamina. Virusul vaccinal ar poseda mici cantităţi de Cu, biotină, flavină şi lipide. Bacteriofagul B. Coli T_2 conţine 2% lipide neutre ceeace îl deosebeşte de celelalte virusuri. Virusul papilomei conţine 1,5% lipide. Virusul encefalomielitei equine conţine fosfolipide, colesterol şi grăsimi neutre.

Tabelul 83

Denumirea virusului	Compoziţia	Denumirea virusului	Compoziţia
Mozaicul tabacului . . .	Nucleoproteine		
Virusul papilomei	Nucleoproteine Lipide 1,5%	Virusul influenţei. . . .	Nucleoproteine Polizaharide Lipide 23%
Bacteriofagul T_2	Nucleoproteine Lipide 2%	Virusul vaccinal	Nucleoproteine biotină, Cu, flavină, lipide 4%
Encefalomielita equină. .	Nucleoproteine Lipide 48%		

Virusurile plantelor par să aibe structura cea mai omogenă şi anume ar fi constituite aproape în totalitate din nucleoproteine, de unde şi denumirea de *Virus-proteine*. Compoziţia chimică elementară a virusurilor este analoagă cu acea a proteinelor obişnuite. Fosforul este încorporat în molecula acizilor nucleici, sulful în tioaminoacizii: cistina, cisteina, metionina din moleculele proteinei.

Compoziţia elementară a câtorva virusuri este dată în tabelul 84.

Tabelul 84

Analiza elementară şi compoziţia unor virusuri purificate.

Virusul	C	H	N	P	S	Proteine	Acizi nucleici	Glicide	Lipide
Mozaicul tutunului. . . .	51	7,6	15,6	0,6	0,2	94	6	2,3	—
Virusul influenţei	53	—	10	0,9	—	67	5	—	23
Vaccina.	33,7	—	15,3	0,57	—	83	5,6	—	4
Virusul poliedrei viermelui de mătase.	54,3	7	13,7	0,43	1,08	—	—	—	1,50
Bacteriofagul Coli T_2. . .	42	—	13,5	4,8—5,2	—	50	45	—	2

Compoziţia chimică a virusurilor omului şi animalelor se apropie de acea a componentelor citoplasmatice normale ale celulei şi este diferită de acea a virusurilor plantelor.

Acizii nucleici din virusuri

Cantitatea de acid nucleic din diversele virusuri variază între 6% (virusul mozaicul tutunului) şi 37% la Bacteriofagul T_2 şi 40% (virusul petelor circulare ale tutunului), (vezi tabelul 85). Acizii nucleici din diversele virusuri animale sunt de tip ribonucleic şi desoxiribonucleic, iar la plante se pare că ar exista numai sub forma acidului ribonucleic. Bacteriofagul şi virusurile vaccinale conţin numai acid desoxiribonucleic; în virusul influenţei se găsesc ambii acizi. In tabelul de mai jos este dată proporţia diverşilor acizi nucleici din câteva virusuri. Se constată diferenţe

foarte mari în conținutul acestora, dar nu se știe care este semnificația acestor diferențe. Acidul ribonucleic din virusul mozaicul tutunului a fost studiat mai în detaliu. Pentru a nu altera structura sa puternic polimerizată este necesar să se întrebuințeze metode de extracție mai puțin brutale. Astfel acidul nucleic din acest virus este puternic depolimerizat

Tabelul 85

Acizii nucleici din diversele virusuri

Denumirea virusului	Acid ribonucleic	Acid desoxiribonucleic
Virusul influenței	3%	2%
Virus vaccinal	—	5,6%
Virusul mozaicul tutunului	6%	—
Virusul petelor circulare ale tutunului	40%	—
Bacteriofagul T_2	—	37%

când este extras cu alcali și are o greutate moleculară egală cu 15.000; extras prin căldură are o greutate moleculară de 300.000, în soluție este puternic vîscos și prezintă fenomenul dublei refracții de scurgere. Acidul nucleic din mozaicul tutunului este acid ribonucleic conținând bazele purinice: guanine și adenine; bazele pirimidinice: citozine și urecilul, pentoza este riboza. Este interesant faptul că toate tulpinile de virus al mozaicului tutunului conțin aceași cantitate de acid nucleic și totuși posedă proprietăți diferite; este probabil că aceste diferențe să fie datorite componenței proteinice. Această interpretare a făcut să se cerceteze compoziția în aminoacizi a acestor proteine. Intr'adevăr s'a constatat diferențe în conținutul unor aminoacizi din structura proteinei.

Virus-proteine

Componenta proteinică din virusuri este foarte importantă. Conținutul în proteine este mai mare decât 50%. In cazul virusului mozaicul tutunului ea reprezintă 98‰. In general proteinele din virusuri sunt proteine bazice de tipul protaminei și histonei, proteina din virusul mozaicul tutunului fiind probabil de tipul globulinelor. Analiza aminoacizilor indică la acestea din urmă un conținut de numai 11,5% aminoacizi bazici și 25% aminoacizi dicarboxilici. Rezultatele studiului mai adânc al acestei proteine arată că activitatea virusului este legată de prezența grupărilor carboxilice libere (Tovarniţki), fenolice și indolice libere, blocarea acestora de exemplu cu fenol duce la o pierdere a activității. Dăm în fig. 3 o cromatogramă a aminoacizilor hidrolizatului virusului Poliedriei viermelui de mătase. Conține următorii 16 aminoacizi în procente: cisteina 0,7%; acidul aspartic 2,6%; arginina 9%; histidina 2,5%; lizina 10,6%; leucina 6,1%; serina 6,4%; acid glutamic 5,3%; alanina 2,4%; prolina 4,7%; tirozina 9,3%; fenilalanina 6,7%; triptofanul 4,5%; isoleucina (nedeterminat); ornitina (nedeterminat).

Variabilitatea virusurilor se explică în momentul de față printr'o modificare a aminoacizilor din componența proteinelor. Această modificare ce poate fi de ordin calitativ sau de ordin cantitativ, duce la formarea de noi tulpini de virus, cu proprietăți biologice și serologice diferite și care sunt imunochimic diferite. Aceste deosebiri ale variantelor față de

forma inițială sunt în primul rând condiționate de grupări aromatice din molecula proteinei, grupări care se știe că sunt serologic cele mai importante. Intre diversele variante nu există deosebiri în conținutul în acizi nucleici, deasemenea între variante și tulpina de plecare, conținutul și natura acizilor nucleici din moleculă este aceeași și este foarte probabil că diferențele constau în orânduirea acestor aminoacizi în moleculă. Preparate purificate de virusul influenței au fost studiate comparativ. Acestea produc boli serologic și imunologic diferite. Diferențele chimice constau în diferențe ale componentelor aminoacide, conținutul în arginină, acid glutamic, lizină, triptofan și tirozină, fiind diferit.

Este sigur că aceste modificări de structură a moleculei proteinice sunt datorite influenței mediului exterior, care duce la o orientare diferită a proceselor de sinteză celulară.

Formarea virusurilor

Sinteza virus-proteinelor este probabil ana'oagă cu aceea a proteine'or în general. Producerea de virus este întovărășită de o producere de proteine și este probabil că se formează printr'un mecanism identic. Variabilitatea virusurilor trebue pusă în legătură cu observațiile cercetătorilor sovietici cu privire la specificitatea antigenică a proteinelor ca fiind condiționată nu de macromolecula proteinică, ci de anumite componente din structura acesteia. Virus-proteinele am văzut că posedă o serie de caractere, de care trebue ținut seama atunci când se caută o interpretare a mecanismului lor de formare. Rezumăm aceste caracteristici :

1. Cresc numai în prezența unor celule vii adecvate.

2. Formarea virusului este legată de creșterea și metabolismul activ al celulei-gazdă, deoarece virusul nu conține enzimele necesare acestor reacții. Unii autori susțin însă, că virusul ar avea capacitatea de a se sintetiza din el însuși, din elemente structurale simple. Acest mecanism necesită energie din afară. Levaditi admite că gazda furnizează energia cerută pentru formarea virusurilor.

3. Virusurile sunt formate în general în prezența celulelor speciilor înrudite, dar pot crește uneori și în prezența celulelor unor specii foarte îndepărtate. Pentru virusul bacteriilor (bacteriofag) anumite experiențe indică formarea acestora și în suspensii celulare în care creșterea este împiedicată de prezența penicilinei, deci nu ar fi necesare celulele în creștere pentru formarea virusului. In schimb, dacă se adaugă în sistem inhibitori ai formării acidului adenozintrifosforic (azide, floruri, iodoacetați) bacteriofagul nu se mai formează, probabil din lipsa donatorilor de energie care sunt acizii adenilici. Geneza virusurilor trebue privită din punctul de vedere al unui proces intim legat cu al celulei-gazdă.

BACTERIOFAGUL

Bacteriofagul este virusul bacteriilor. Prezența acestuia în culturile bacteriene se manifestă printr'o liză a celulelor bacteriene, liză care duce la limpezirea acestor culturi. Dacă o picătură din această cultură lizată este adăugată unei alte culturi, are loc și în această cultură, astfel inoculată, procesul de liză, procesul de clarificare. Prin inoculări succesive acest proces se poate transmite indefinit. Agentul care provoacă acest

fenomen de liză, de desintegrare bacteriană, a primit numele de bacteriofag (d'Herelle). Proprietățile generale ale bacteriofagului sunt următoarele:

Bacteriofagul se multiplică în timpul creșterii și lizei culturilor bacteriene infectate; în timpul multiplicării germenilor cantitatea de bacteriofag se mărește. Bacteriofagul are dimensiuni destul de mici pentru a putea trece prin filtrele care rețin bacteriile; nu se depun decât în centrifugele cu viteză mare. Bacteriofagii sunt extrem de specifici în raport cu tulpina din care provin nu au acțiune litică decât asupra acestei tulpini sau a uneia foarte analoagă, aceasta permițând o diferențiere a virusurilor. Există însă posibilitatea de adaptare dela o tulpină la alta.

Bacteriofagul este inactivat prin radiații diverse, temperaturi înalte, toxice.

Bacteriofagul are caracter antigenic; inoculat la animale produce anticorpi specifici. Specificitatea lui serologică servește la clasificare. Antigenul bacteriofagului este caracteristic acestuia și diferit de al bacteriei corespunzătoare. Printre bacteriofagii mai bine studiați au fost: bacteriofagii anti B. Escherica Coli, notați cu T_1, T_2, T_3 . . . T .

Se poate obține o purificare a bacteriofagului prin cultivare lui pe medii sintetice și centrifugări fracționate ale mediului de cultură, prin adsorbții și eluții.

COMPOZIȚIA CHIMICĂ A BACTERIOFAGULUI COLI PURIFICAT (T_2)

Bacteriofagul T_2 are o greutate de 10^{-15} gr pe unitate infectată. Are structura unei nucleoproteine, respectiv proteină și acid desoxiribonucleic, din care 40% acid desoxiribonucleic; caracteristic este acest conținut mare în acid desoxiribonucleic. Conține C: 40%, H: 5,3%, N: 14,3%, P: 8,8%, glucozamina mai puțin ca 1/10% și aproximativ 1% glucoză. Aproximativ 1×10^{-16} grame proteină bacteriofag purificată produce liză și dacă se presupune că această cantitate corespunde unei molecule, atunci greutatea moleculei gram de substanță va fi de aproximativ 30×107 grame valoare, apropiată de aceea găsită cu ajutorul ultracentrifugării. Mecanismul reacției dintre bacterie și bacteriofag ar consta într'o fixare a bacteriofagului de către celula bacteriană. Dacă bacteria este moartă, bacteriofagul este inactivat. Celula vie după adsorbția bacteriofagului se divide cu același ritm sau mai repede și după un anumit interval se lizează, se desintegrează. In timpul multiplicării bacteriei se multiplică și bacteriofagul; probabil în interiorul celulei și în timpul lizei este eliberat. Virusul utilizează echipamentul enzimatic al gazdei pentru sintezele proprii.

Intre activitatea fagului și proteina componentă există corelație, insolubilizarea proteinei cu chimotripsină duce la inactivarea fagului. Desoxiribonucleaza care depolimerizează acidul desoxiribonucleic din moleculele fagului distruge numai 30% din activitatea sa, deci o fracțiune din această componentă nu are rol în activitatea bacteriofagului.

Imaginile electronice ale bacteriofagului indică forme de spermatozoizi având un cap și un flagel care le conferă o polaritate și poate o orientabilitate spre germenul sensibil.

Aceste imagini mai indică în culturile contaminate cu bacteriofag, că bacteria este asaltată de mici forme, care după ce au pătruns prin membrană se multiplică până ce provoacă distrugerea complectă a corpului microbian.

CAPITOLUL XII

IMUNOCHIMIA

DEFINIȚIE

Imunochimia cuprinde studiul chimic al antigenelor și anticorpilor, precum și bazele chimice ale imunității. Datorită desvoltării metodelor de cercetare chimice și fizice de mai mare precizie, a fost posibilă o cunoaștere mai amănunțită a structurii chimice a antigenelor, iar prin metode mai precise de determinare a anticorpilor s'au putut stabili în anumită măsură corelațiile dintre structura chimică și reactivitatea imunologică. Imunochimia folosește deci metodele chimice, fizice, fizico-chimice și imunologice.

Inainte de a expune datele cunoscute în acest domeniu, încă în plină desvoltare, trebue definite anumite noțiuni, frecvent folosite în relatarea fenomenelor de imunitate.

Se numește *antigen* orice substanță care, introdusă pe cale parenterală în organism provoacă apariția în ser a unei componente capabilă de a reacționa în mod specific cu substanța introdusă. Substanța având aceste proprietăți care apare în ser, în urma introducerii antigenului, poartă numele de *anticorp*. Animalul în serul căruia s'au format anticorpi prin introducerea de antigen, se zise că este *imunizat*, iar sângele care conține anticorpul este *antiserul* antigenului care a provocat apariția lui.

Prezența anticorpilor poate fi pusă în evidență printr'o serie de reacții caracteristice care se desvoltă atunci când anticorpii sunt puși în contact cu antigenul. Aceste reacții sunt, în genere, în funcție de antigenul folosit pentru imunizare. De exemplu: dacă antigenul folosit pentru inoculare este o suspensie de globule roșii, atunci serul animalului căruia i s'au inoculat aceste globule roșii, va căpăta proprietatea ca, după o serie de inoculări, pus în contact cu aceste globule, să le *aglutineze*; anticorpii din ser, care provoacă această aglutinare vor purta numele de *aglutinine*. Dacă se inoculează unui animal o proteină solubilă, de exemplu ovalbumina cristalizată și după o serie de injecții se recoltează sângele animalului și se pune serul acestuia în contact cu o soluție de ovalbumină, se formează un precipitat consistând din antigen și anticorp; anticorpul care a provocat precipitarea antigenului se numește *precipitină*. Dacă antiserul preparat prin inocularea globulelor roșii sau bacteriilor este adăugat proaspăt unei suspensii de globule roșii sau bacterii care au fost folosite pentru prepararea serurilor se constată o liză a eritrocitelor respectiv

a bacteriilor, anticorpii care provoacă acest fenomen de liză se numesc *lizine*, *hemolizine*, respectiv *bacteriolizine*. Numai serul proaspăt are această proprietate de liză, serul încălzit la 56°C timp de 30′ pierde această proprietate de liză, dar păstrează proprietatea de aglutinare. Puterea litică pierdută a serului încălzit, poate fi însă restabilită prin adăugarea de ser proaspăt al altui animal, în special al serului de cobai. Factorul termolabil necesar pentru liză poartă numele de complement sau alexină şi reacţia dintre antigen şi anticorp se numeşte *fixare de complement*.

Germenii toxici, cum sunt B. difteric, sau B tetanic conţin anumite proteine toxice — aşa numitele *toxine*, care pot avea proprietăţi antigenice. Inoculate la animal în doze subletale sau sub formă detoxificată cu ajutorul formolului, aşa numita formă toxoidă, produc în organismul animalului, apariţia de anticorpi, care creează o stare de rezistenţă la acţiunea toxică, o stare de imunitate faţă de efectul toxinei; serul imun conţine anticorpi antitoxici, *antitoxine*, care dacă sunt amestecate „in vitro" cu o cantitate dată de toxină, neutralizează parţial sau total efectul toxic. Prezenţa anticorpilor antitoxici conferă animalului, în sângele căruia apar, o stare de apărare contra infecţiilor; din acest motiv se numesc *anticorpi protectori*.

O altă manifestare „in vivo" a prezenţei anticorpilor este provocarea, „*şocului anafilactic*". Dacă se inoculează unui animal un antigen şi 10—12 zile dela injecţia iniţială se administrează intravenos o a doua injecţie, poate avea loc o imediată reacţie caracterizată printr'o serie de fenomene: mâncărimea pielei, edeme, dispnee, tuse, convulsii şi uneori moarte prin sufocare. Intervalul de 10—12 zile între cele două inoculări este necesar pentru formarea anticorpilor faţă de antigen, care unindu-se „in vivo" cu antigenul, produc şocul anafilactic. Se poate provoca şocul anafilactic prin inocularea de ser imun conţinând anticorpi în cazul inoculării iniţiale cu antigen. Animalele care au primit o injecţie iniţială de antigen, se zice că sunt „activ sensibilizate" iar acelea cărora li s'a administrat o injecţie iniţială de ser, conţinând anticorpi, se zice că sunt „pasiv sensibilizate". Doza iniţială inoculată se numeşte *doză sensibilizantă*, iar doza care provoacă şocul anafilactic, *doză declanşantă*.

Anticorpii cu proprietatea de a fagocita antigenele lor homoloage sunt *opsoninele*. Unul şi acelaş corp se poate pune în evidenţă prin diverse reacţii de precipitare, aglutinare, fixare de complement, sensibilizare pasivă, protecţie contra infecţiilor, etc. Toate aceste reacţii fiind datorite unui şi aceluiaş anticorp—tipul de reacţie fiind dependent de felul orânduirii experienţei.

Pentru ca o substanţă să poată provoca elaborarea de anticorpi în organismul în care a fost introdusă, trebue să aibă o structură chimică diferită de aceea a componentelor organismului şi să fie de origină specifică diferită, de exemplu hematiile unei specii pot funcţiona ca antigen în organismul altei specii, dar nu în organismul aceleiaşi specii.

HAPTENELE

Substanţele, care inoculate nu duc la formare de anticorpi, dar care sunt capabile de a reacţiona în mod specific cu anticorpii existenţi printr'un ser imun (precipitare, fixare de complement), etc. au fost numite haptene; sunt deci semiantigene sau parţial antigene, deoarece au numai una din

Scanned with OKEN Scanner

cele două însuşiri care caracterizează un antigen şi anume au proprietatea de a reacţiona cu anticorpii, dar nu au capacitatea de a stimula formarea de anticorpi.

De exemplu, polizaharizii extraşi din diversele bacterii pot precipita cu serurile preparate prin inocularea la animal a germenilor respectivi, dar inoculate ca atare nu pot stimula apariţia acestor precipitine.

Studii recente au arătat însă că nu există o strictă demarcaţie între antigene şi haptene şi anume aceeaşi substanţă poate funcţiona ca antigen inoculat la un animal şi ca haptene inoculate la alt animal, ceeace a pus în evidenţă faptul că antigeneitatea este în anumită măsură în funcţie de specia imunizată.

Deasemeni caracterul de antigen şi de haptenă mai este în funcţie şi de calea de inoculare.

NATURA CHIMICĂ A ANTIGENILOR

In general, ca o substanţă să fie antigenică, trebue să îndeplinească anumite condiţii fizico-chimice :

Să aibă în soluţie caracter coloidal (să aibă greutate moleculară mare), să fie hidrolizabilă. Marea majoritate a substanţelor antigenice sunt de natură proteică şi s'a încercat a explica această preponderenţă a proteinelor pe baza proprietăţilor lor fizico-chimice. Nu orice proteină poate fi un antigen complect. Este importantă prezenţa grupărilor aromatice în moleculă.

Gelatina care nu are tirozină şi triptofan, iar fenilalanina în cantitate redusă, nu funcţionează ca antigen. Legătura între acţiunea antigenică şi prezenţa radicalilor aromatici este foarte probabilă. Totuşi există în natură componente neproteice, care pot funcţiona ca antigene. De exemplu, polizaharidele capsulare, tip specifice extrase din pneumococi, inoculate la şoarece şi om, induc o imunitate activă, deşi la iepure nu sunt antigenice.

Funcţia de formare de anticorpi a anumitor substanţe poate fi intensificată cu ajutorul substanţelor nespecifice. De exemplu, polizaharidele bacteriene pot fi transformate din haptene în antigene complecte prin cuplare cu o proteină oarecare. Cu ajutorul antigenelor chimic modificate prin introducerea în moleculă a unor grupări cunoscute, de exemplu formarea de azoproteine, s'a constatat că analogia de structură poate da naştere la reacţii antigenice încrucişate.

Complecşii neproteici, dar care conţin peptide în moleculă sunt antigenele, glucido, lipido, peptidice extrase din aproape totalitatea germenilor *Gram negativi* componente identice cu endotoxina bacteriană.

EXOTOXINELE ŞI ENDOTOXINELE

Exotoxinele sunt antigene toxice sintetizate de celula bacteriană şi eliminate de aceasta în mediul înconjurător (organism sau mediu de cultură). Sunt antigenice, deci determină în organism apariţia de anticorpi — respectiv *antitoxine*, care pot neutraliza toxina, prin combinarea cu aceasta, atât in vivo cât şi in vitro.

Exotoxinele sunt de natură proteică sau foarte intim legate de o proteină. Sunt termolabile, sunt distruse prin încălzire între 60°—80°. Sunt solubile în apă. Pot fi uscate în vid, fără a-şi pierde proprietăţile carac-

teristice. Cea mai bine studiată dintre toxine este toxina difterică. (Unii autori cred că ar fi componenta proteică a enzimei de respiraţie a celulei — cytocromul C) Este distrusă de enzimele proteolitice sub acţiunea cărora îşi pierde proprietăţile toxice şi cele antigenice. Sub acţiunea aldehidei formice îşi pierde complect proprietăţile toxice, păstrându-şi proprietăţile antigenice, se transformă în anatoxină (formoltoxoidul). Anatoxina difterică a fost obţinută sub formă cristalizată. Anatoxinele sunt folosite pentru prepararea serurilor antitoxice.Sunt folosite deasemenea în vaccinurile contra toxiinfecţiilor. Enzimele proteolitice nu au acţiune identică asupra tuturor toxinelor elaborate de diverşii germeni; astfel toxina botulinică de o extrem de mare toxicitate rezistă acţiunii enzimelor proteolitice.

Un acelaş microb poate elabora mai multe exotoxine cărora le corespunde câte un anticorp specific. Stafilococul posedă 3 toxine una *letală*, una *hemolitică* şi a treia *leucocidina* care distruge leucocitele — aceasta ar avea o acţiune analoagă enzimelor proteolitice.

Endotoxinele sunt componente ale celulei bacteriene, nu sunt eliberate în mediu de cultură decât după dezagregarea celulară (autoliză sau agenţi chimici şi fizici). Endotoxinele au fost izolate numai din germenii Gram negativi.

Endotoxina germenilor Gram negativi, antigenul Boivin, are o structură glucido-lipido-polipeptidică. Endotoxinele acestea au caracter antigenic. Sunt mai puţin toxice ca exotoxinele. Endotoxina Boivin a fost extrasă numai din formele netede „S" ale germenilor Gram negativi şi nu din formele „R"; din acestea din urmă se extrage numai haptena componenta glucidică.

NATURA CHIMICĂ A ANTICORPILOR

Anticorpii sunt fără îndoială de natură proteinică. Se admite în general că ar aparţine globulinelor şi anume ar fi serumglobuline modificate, astfel încât să reacţioneze cu antigenul homolog. Nu se ştie însă nimic asupra modificărilor chimice necesare transformării unei molecule de globulină serică normală într'o moleculă de anticorp.

Faptul că nu s'a reuşit încă prepararea anticorpilor şi serumglobulinelor sub formă complect pură, deşi aceştia apar homogeni la ultracentrifugare. îngreuiază cunoaşterea structurii reale a acestor componente. S'au stabilit anumite diferenţe fizico-chimice între proteinele serurilor normale şi serurile imune. Astfel, pH-ul izoelectric al fracţiunii protèinice fixate de anticorpi de tip I, este 4,8 la serul normal 5,7. Dimensiunea particulelor la ultracentrifugare este diferită.

Imaginile electroforetice ale tuturor serurilor hiperimune, (iepure) care deci conţine cantităţi suficiente pentru determinări mai precise, arată că anticorpul din serurile antibacteriene este asociat cu y-globuline, iar în serurile antitoxice ar fi asociat cu două componente şi astfel antitoxina apare în y-globulină după o scurtă perioadă de imunizare, iar după o perioadă mai lungă de imunizare, apare ca o componentă ce migrează foarte aproape de β-globulină respectiv între γ şi β-globulină.

Anatoxina difterică a fost obţinută sub formă cristalizată; este o proteină pură, amestecată cu o globulină normală. Nu poate fi separată de aceasta prin niciunul din mijloacele chimice sau fizice, ci doar prin

precipitare cu antigenul homolog. Aceste fapte dovedesc că anticorpii sunt chimic şi imunologic deosebiţi de proteinele serice normale. S'a constatat că anticorpii diverselor specii animale ar fi asociaţi cu diferite proteine serice. Fracţiunea proteinică purtătoare de anticorpi antitoxici (difterie) este mai rezistentă la acţiunea enzimelor proteolitice, decât proteina normală. Această proprietate este folosită în purificarea şi concentrarea serurilor antitoxice.

FORMAREA ANTICORPILOR

Problema formării anticorpilor este una din problemele cele mai mult desbătute şi au fost elaborate mai multe teorii, care să explice această formare; multe din ele nu au putut fi susţinute de către faptele experimentale obţinute ulterior.

Teoria lui Ehrlich a catenelor laterale a jucat un rol important în imunologie. După teoria lui Ehrlich celula trebue să fie considerată ca fiind alcătuită din agregate chimice complexe cu grupuri moleculare ataşate, constituind catene laterale sau receptori, care stabilesc contactul între celulă şi substanţele din mediu. Substanţele străine cu proprietăţi antigenice pot exercita o acţiune asupra celulei numai prin mijlocirea acestor receptori şi determină o reacţie din partea acesteia. Antigenele ca substanţe străine, neavând rol în economia celulară, determină o deviere a receptorilor dela modul lor de funcţionare normală; celula astfel stimulată produce noi receptori de acelaş tip cu cei scoşi din funcţie.

Producerea devine repede excesivă şi surplusul de receptori sunt aruncaţi din celulă în plasma înconjurătoare, constituind aici anticorpii specifici.

Deci, după Ehrlich receptorii reprezintă grupări atomice desfăcute din celulă, care intră în componenţa protoplasmei celulare şi care participă în procesul de schimb celular. Deoarece pentru aceste grupuri antigenul are o anumită afinitate, conferă un caracter specific reacţiei între antigen şi anticorp.

Gamaleia a formulat ipoteza cunoscută sub numele de „teoria amprentelor". După Gamaleia receptorii nu există în celulă, ci se formează ca o reacţie la excitarea produsă de antigen, coloizii celulari fiind supuşi legii după care acţiunea care provoacă o stare de desechilibru, duce la o reacţie care tinde să anihileze această acţiune (H. Chatelier). Antigenii acţionând asupra celulei provoacă aci modificări, care au o structură identică cu aceştia însă contrarie. Antigenul trecând prin celulă lasă o amprentă şi dacă ulterior celula elimină aceste amprente, ele vor avea o afinitate specială pentru antigenul care le-a produs. Fiind analoage unui mulaj fidel al antigenului, aceste amprente sunt legate în modul cel mai strâns de antigen.

Culicov susţine că introducând în organism compuşi ionogeni, se distruge echilibrul ionic care provoacă ioni antagonişti antiioni. Complexul ionogenic nu poate însă pătrunde în celulă şi devine centrul complexului de forţe ale energiei chimice, ceeace distruge echilibrul organismului, ionii antagonişti încearcă că compenseze echilibrul ionic.

Breinl şi *Hoarowitz* cred că anticorpii reprezintă o globulină diferită de globulina serică normală care se formează printr'o acţiune directă a antigenulni introdus în organism, acesta modificând-o.

Scanned with OKEN Scanner

Combinaţiile noi de peptide şi aminoacizi care apar sub acţiunea antigenului, produc o globulină nouă care păstrează amprenta fizico-chimică a antigenului.

L. Pauling susţine cu argumente fizico-chimice interpretarea autorilor de mai sus.

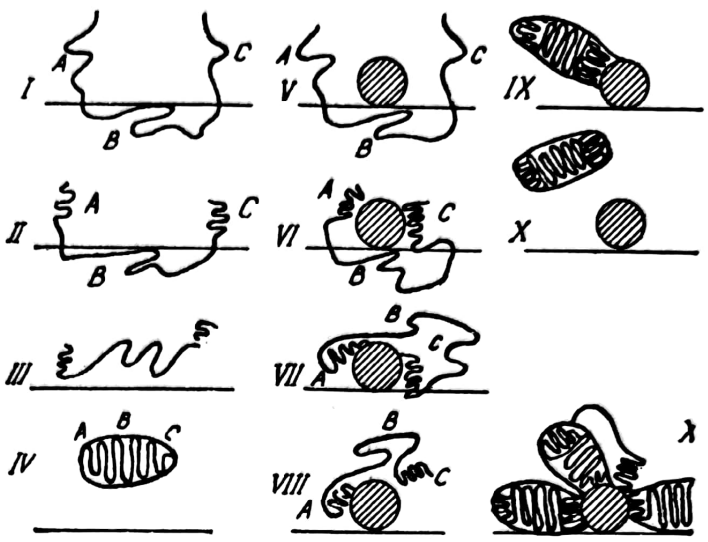


Fig. 180. Ilustrarea teoriei lui Pauling.

După L. Pauling anticorpul nu se deosebeşte în însăşi structura lui de o globulină normală. El admite că anticorpul are aceeaşi catenă polipeptidică ca şi această globulină normală şi diferenţa constă în configuraţia catenelor, respectiv în starea de torsionare a acestora. Ilustrarea schematică este dată în figura nr. 180, care arată formarea unei globuline normale. Se admite ca radicalul de aminoacizi care se află în partea mediană (B) a unei catene lungi polipeptidice pe cale de sinteză este relativ stabil. Extremităţile (A) şi (C) au o configuraţie instabilă şi deci au tendinţe de a realiza o stare de echilibru. Această tendinţă se manifestă printr'o rulare a extremităţilor respective, o pliere a acestora, prin aceasta intră în acţiune legăturile de hidrogen şi legăturile de valenţă, mai labile ulterior. Partea centrală B devine liberă (III) şi este antrenat în procesul de pliere care reprezintă optimul de stabilitate în această fază. Prin aceasta se realizează forma definitivă a moleculei globulinice (IV). Acelaş proces, spune Pauling, are loc când în sistem există o moleculă antigenică (V, VI); în acest caz, catenele libere (A şi C) nu se mai plieză ca şi când locul ar fi liber, deoarece atomii şi moleculele dela suprafaţa moleculei de antigen atrag porţiuni complementare din lanţul peptidic şi resping altele; astfel că se formează o combinaţie care în prezenţa antigenului este stabilă şi care datorită structurii lui complementare este atrasă de acesta când porţiunea centrală a catenei peptidice devine liberă.

Se pot întâmpla două lucruri în funcţie de puterea de atracţie dintre antigen şi capetele catenei peptidice, dacă aceste forţe sunt puternice, rămân legate (IX), dacă sunt mai slabe, unul din capetele catenei se poate desface de antigen (VIII), porţiunea centrală se rulează normal şi întreaga moleculă de anticorp rămâne liberă. Ca rezultat apare molecula de globulină în care porţiunea centrală se aseamănă cu porţiunea mijlocie a globulinei normale, iar porţiunile laterale au o configuraţie care complectează pe aceea a antigenului.

Această moleculă de globulină modificată după pecetia antigenului constitue anticorpul.

Pauling şi D. H. Campriball au încercat să sintetizeze „in vitro" anticorpii specifici în absenţa celulelor, punând în contact γ-globulina cu haptena (polizaharidul specific din pneumococul tip III sau coloranţi

azoici cu greutate moleculară mare); prin menținere la temperatură de 57°—65°C timp de 14 zile, urmată de răcire lentă obțin astfel anticorpi artificiali constituiți din globulina modificată.

Cuzin și Nevraeva au verificat datele lui Pauling asupra obținerii anticorpilor in vitro, folosind albastrul de metilen polizaharidele specifice, globulina din serul uman, etc., alcalinizând amestecurile la pH 7,6—7,8 și menținându-le la 57°C.

Rezultatele obținute nu sunt concludente.

Orice ipoteză pentru formarea anticorpilor trebue să justifice următoarele faze experimentale stabilite.

1. Să fie proteine care să reacționeze specific cu antigenul lor.
2. Fiind produse de către antigene multe și diferite, nu este verosimil ca numai una din moleculele de antigen să existe la animalul normal.
3. Producerea lor în cantitate mare, în comparație cu cantitatea de antigen care provoacă formarea lor.
4. Anticorpii ar continua să se formeze și după complecta dispariție a antigenului; următoarea experiență ar susține acest punct de vedere: limfocitele maligne dela șoareci conțin anticorpi; inoculate la un animal produc în sângele acestuia anticorpi (deci fără prezența antigenului). Injectarea la un al treilea animal, duce deasemenea la formarea de anticorpi. Această experiență repetată de foarte multe ori și la mai multe generații, arată că procesul de formare a anticorpilor odată inițiat, se poate produce și în absența antigenului. Aceste fapte experimentale, dacă vor fi confirmate, necesită modificarea tuturor ipotezelor care admit că anticorpii sunt formați prin stabilirea unei relații (fizice sau chimice) între globulină și antigen și pledează pentru o formare a anticorpilor în celule, probabil în limfocite.

Teoriile moderne asupra formării anticorpilor se bazează pe o analogie între formarea *anticorpilor și a enzimelor adaptative* (Burnat).

Atât anticorpii cât și enzimele adaptative au o relație specifică față de substanța care a provocat formarea lor. Reacțiile enzimelor cu substanțele care se formează în timpul reacției este similară cu reacția între antigen și anticorp. Globulina normală ar fi sintetizată de o proteinază specială. Introducerea antigenului duce la o reacție între proteinază și antigen, care distruge antigenul și modifică proteinaza. Această proteinază modificată produce formarea anticorpului în locul globulinei normale și în acelaș timp produce replicate ale ei.

Proteinaza modificată care rezultă din reacția cu antigenul descrește gradul când antigenul nu mai este prezent, exact ca în cazul enzimelor adaptive.

Această interpretare a mecanismului de formare a anticorpilor explică diferențele calitative și cantitative ale acestor anticorpi și explică continuarea formării anticorpilor după dispariția antigenului. Această teorie poate fi justă dacă se admite că anticorpii există în limfocite și în ser, deoarece altfel ar trebui admis că polizaharidele presupuse a fi prezente în ser, ar trebui să formeze anticorpi, dacă serul care le conține este injectat diverselor animale; ori, injecția de antiser nu duce la producerea de mulți anticorpi, ci din contra anticorpul injectat dispare repede.

Sevag admite că toate proteinele sunt enzime și că anticorpii sunt formați ca un rezultat al acțiunii antigenelor și acestor enzime asupra globulinelor normale.

Scanned with OKEN Scanner

Teoria formării anticorpilor din proteinogēne (Northrop) admite şi analogia între anticorpi şi enzime adaptative. Această teorie admite următoarele :

1. Priotenele normale din ser sunt formate din precursorii lor, proteinogenele printr'o reacţie autocatalitică.

2. Antigenul (sau compusul lui de descompunere) acţionează ca o coenzimă şi provoacă formarea de enzime adaptative. Proteina rezultantă reacţionează cu coenzima respectivă, antigenul care a provocat formarea (se ştie că în general produsele reacţiei enzimatice reacţionează cu enzima care le produce).

3. Anticorpul este format aproape în totalitate în celulele în care este sintetizat proteinogenul. Aceste ipoteze explică următoarele fapte :

a) Anticorpii sunt corelaţi cu proteinele serice normale şi reacţionează cu antigenul care duce la formarea lui.

b) Mici cantităţi de antigen pot produce cantităţi indefinite de anticorp.

c) Producerea de anticorpi poate continua după ce tot antigenul a dispărut din circulaţie, dar nu după ce toate produsele de descompunere au dispărut.

4) Anticorpii pot fi corelaţi cu una sau mai multe proteine normale, în funcţie de reacţia catalitică de care este legat antigenul.

5) Formarea anticorpului însuşi nefiind o acţiune autocatalitică, nu se va forma mai mult anticorp, când antigenul este inoculat la animale.

Anticorpii nu sunt formaţi în absenţa celulei, ci în, sau aproape de celulele sintetizante, care conţin proteinogene şi unde există donatori de energie necesari sintezei.

Conform acestei interpretări este posibilă o producere de anticorpi „in vitro" fapt care a fost realizat (Ostronislenskii : L. Pauling — 1940).

Dificultatea însă a producerii de anticorpi „in vitro" prin adăugarea serului poate fi datorită faptului că în organism splina ar avea un rol important în formarea anticorpilor.

Extracte de splină dela animalele imunizate dau naştere la anticorpi, atunci când sunt inoculate la animale, ceeace a sugerat că splina ar conţine un derivat intermediar al antigenului şi că acest intermediar este responsabil de formarea actuală a anticorpilor.

Experienţa folosind hexokinaza ca antigen (Price 1947) indică că extractele de splină inoculate la animal dau naştere la anticorpi cu toate că nu reuşeşte să pună în evidenţă hexokinaza în acest extract, deşi se obţine un test pozitiv chiar pentru un gamma hexokinază.

Injecţia de antigene dă naştere după câteva zile unei creşteri rapide de anticorpi în circulaţie, iar o a doua injecţie în unele cazuri produce o creştere şi mai mare. Curba are o formă logaritmică, ceeace ar putea indica un anumit proces de multiplicare biologică.

COMBINAREA ANTIGENULUI CU ANTICORPUL

Ehrlich susţine că între antigen şi anticorp are loc o combinaţie chimică de tipul combinaţiei între un acid şi o bază.

Alţi autori admit că reacţia antigen — anticorp este dirijată de legea acţiunii maselor.

Bordet priveşte combinarea anticorpului cu antigenul ca o combinare între coloide, un proces de adsorbţie, reacţia de combinare fiind de tip

difazic. In prima fază se produce adsorbția, adică fixarea specifică a antigenului și anticorpului, în faza a doua aglutinarea sau precizarea și sedimentarea sub acțiunea ionilor a complexului antigen—anticorp.

După Heidelberger reacția anticorp-haptenă ar fi constituită din reacții chimice care se petrec între anum te grupuri moleculare, deci în reacția antigen-anticorp ar avea loc o grupare specifică, o combinație. După Morach, anticorpul posedă mai multe grupe cu care se poate uni cu antigenul, nu numai una singură. Acest autor presupune că în combinarea moleculelor de anticorp cu antigenul, grupurile polare de care depinde solubilitatea globulinei din anticorp sunt îndreptate unele către altele și se atrag astfel că afinitatea pentru apă este pierdută.

Prin blocarea grupurilor polare în urma modificării moleculei de anticorp, solubilitatea agregatelor scade și se formează agregate care se depun. In reacția antigen-anticorp apar agregate sub formă de rețea în care particulele de antigen și anticorp au o poziție alternativă.

După Pauling anticorpul are caracter bivalent, admițând că în anticorp există cel puțin două grupări polare, care au o așezare specifică și care determină combinarea cu antigenul, acesta din urmă fiind multivalent, având pe suprafața lui câteva grupări determinante. Fiecare particulă de anticorp este fixată de două particule de antigen, iar fiecare particulă de antigen este fixată de mai multe particule de anticorp. Se formează astfel structuri dense care pot crește în dimensiuni și are loc sedimentarea lor sub formă de agregate.

După acest autor punțile de hidrogen au un rol important și determină configurația moleculei proteinice.

IMUNITATEA ȘI SISTEMUL NERVOS AL ORGANISMULUI

Problema intervenției sistemului nervos a fost studiată din trei puncte de vedere : 1) proprietățile nervului de a transmite excitația imunizatorie, 2) importanța reflexelor condiționate în imunitate, 3) rolul sistemului central și periferic în patogenie și imunitate.

Se constată că transmiterea excitației antigenice prin nerv este posibilă pe cale reflexă.

Matelnicov a emis ipoteza importanței reflexelor condiționate în procesele imunologice. După Speranski procesele infecțioase nu ar fi specifice în tot timpul desfășurării lor, agentul specific inițiază numai procesul, desfășurarea fiind subordonată ulterior acțiunii neurotrofice, microbul fiind numai un punct „istoric" într'un proces infecțios (Zilber).

Rolul principal de conducere, rolul coordonator aparține sistemului nervos central și acesta exercită o influență esențială asupra proceselor de imunitate.

Acțiunea sistemului nervos central se exercită în special asupra uneia din mecanismele cele mai eficace ale imunității, asupra fagocitozei. Benetato a demonstrat influența sistemului nervos asupra fagocitozei, la câinii normali și injectați cu Salmonella typhi.

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

ADO A. D. — Teoria alergiei în stadiul actual. *Patologiceschi Arhiv* 1951, nr. 3, p. 3.

AFANASIEV V. P. — Despre natura activităţii fermentative. Mecanismul şi cinetica acţiunii fermenţilor. *Izvest. Acad. Nauc S.S.S.R.*, 1949. Seria Biol. nr. 3, p. 253—269

ACHIMOVA N. L. — Despre structura proteinelor şi a macromoleculei lor. *Uspehii Himii*, 1950, vol. 19, ed. 6.

ASMARIN I. P. — Studierea proprietăţilor proteinelor de contracţie cu ajutorul unor noi metode sistematice. *Biochimia*, 1951, nr. 3.

AVAEVA S. M. — Problema sintezei proteinelor. *Priroda*, 1949, nr. 12, pag. 15.

BÂCICOV S. M. — Date noi despre acidul hialuronic şi hialuronidază. *Uspehi Sovremen*. Biol., 1949, nr. 3.

BALDWIN E. — Aspectele dinamice ale biochimiei, 1949.

BARRON E. S. G. — Mecanismul metabolismului glucidic. *Advances in Enzymology*, 1943, 3, 149, 73, 157.

BEST H. CH. TAYLOR N. C. — Bazele fiziologice ale practicii medicale, 1950.

BOULANGER P. — Consideraţii asupra metabolismului intermediar al aminoacizilor. *Exposés ann. de Biochimie Médicale*, X-e série.

BRACHET J. — Embriologie chimică, 1948.

BRACHET J. — Sinteza proteinelor şi a ribonucleoproteinelor. *Exposes ann. de Biochimie Medicale*, 1951, XII-e série.

BRAJNICOVA G. M. — Principiile de izolare şi purificare a substanţelor antibiotice. *Uspehi Sovremen*. Biol., 1950, vol. 29 nr. 3.

BRAUNŞTAIN A. E. — Biochimia metabolismului aminoacizilor, 1949.

BRAUNŞTAIN A. E. — Concepţia lui F. Engels despre proteine ca bază a vieţii în lumina datelor biochimiei moderne. 1950, Ed. Acad. Med., pag. 21.

BRAUNŞTAIN A. E. — Transaminarea şi funcţia integrativă a acizilor dicarboxilici în metabolismul azotului I. Institutul de Chimie biologică şi medicală al Academiei de Ştiinţe din U.R.S.S., Moscova. *Advances in Protein Chemistry*, vol. 3, 2, 1947.

BRAUNŞTAIN A., CRIŢMAN M. G. — *Enzimologia*, 1937, 2, 129—146.

BRESLER E. S. — Unele consideraţii privind biosinteza proteinelor. *Uspehi Sovremen*. Biol., 1950, vol. 30, nr. 1 (4).

BRESLER E. S. — Unele consideraţii privind biosinteza albuminei. *Uspehi Sovremen*. Biol. 1950, vol. 30, Ed. 1 (4).

BRESLER E. S., FINOGHENOV A. P. — Metoda de electroforeză a proteinelor. *Biochimia*, 1950, vol. 15, nr. 2.

BREUSCH F. L. — Biochimia catabolismului acizilor graşi. *Advances in Enzymology*, 1948, 8, 343.

BUCHIN N. B., ARESCHINA I. L. — Provitaminele şi vitaminele A şi D ca grupe prostetice. *Biochimia*, 1950, vol. 15, nr. 5.

CAMPBELL H. D. — Structura anticorpilor. *Annual Rev. of Microbiology*, 1947, vol. 1.

CASAVINA S. B., CUNNEVA I. Z. — Studiul biochimic al proteinelor de contracţie din muşchii scheletici ai omului şi animalelor. Docl. Acad. Nauc S.S.S.R., 1950, nr. 4.

CERCASOVA L. S., MEREJINSCHI M. F. — Compoziţia chimică a ţesuturilor dentare şi procesele biochimice ce au loc în interiorul lor. *Stomatologhia*, 1950, nr. 4, pag. 19—22.

CAEDROVSCHI V. B. — Acidul ribonucleic şi rolul lui în desvoltarea şi funcţiile celulei. *Uspehi Sovremen Biol.*, 1951, nr. 1.

COHN E. J., EDSALL I. T. — Proteine, aminoacizi şi peptide ca ioni şi ioni difolari, 1943.

CONICOVA S. A., M. G. CRIŢMAN. — Utilizarea metodei isotopilor în microbiologie. *Microbiologhia*, 1950, vol. 20, nr. 1.

Scanned with OKEN Scanner

CREPS M. E. — Carboanhidraza în sistemul nervos. *Fiziologhiceschi Jurn. S.S.S.R.*, 1950, nr. 1, 97—110.
CRIŢMAN M. G., CONICOVA A. S. — Sinteza aminoacizilor în organismul animal şi în celula bacteriană. *Uspehi Biologhicescoi Himii*, 1950, vol. I, pag. 203—215.
DOERR R. — Tratat de virologie, vol. I, II, 1938.
DOERR R. — Imunologia, vol. I—VI, 1944—50.
DUBOS R. J. — Celula bacteriană, 1946.
DUBUISSON M. — Proteinele musculare. *Exposés ann. de Biochimie Médicale*, 1948, IX-e série.
ENGELHARDT V. A. — Proprietăţile adenozintrifosfatazice ale miozinei. *Advances in Enzymology*, 1946, 6, 147.
ENGELHARDT V. A. — Progrese noi în enzimologie, 1946, 6, 147.
ENGELHARDT V. A., N. M. LIUBIMOVA. — 1939. *Nature*, 1944, 668.
EPSTEIN I. A. — Repartiţia electroliţilor între celulă şi mediul înconjurător. *Uspehi Sovremen. Biol.* 1949, vol. 27, nr. 2, pag. 211—226.
FIODOROVA A. T., CONICOVA S. A. — Conţinutul în aminoacizi liberi în unele organe şi ţesuturi ale animalelor. *Docl. Acad. Nauc. S.S.S.R.* 1950, nr. 4, pag. 737.
FLORKIN M. — Aspecte actuale al enzimologiei. Actualités biochimiques. 1947, nr. 10.
GELHORN G. — Problema permeabilităţii, 1929.
GULLAND, BARKER, JORDAN. — Chimia acizilor nucleici şi a nucleoproteinelor. *Ann. Rev. Biochemistry*, 1945, 14, 175.
HEVSEY G. — Aplicarea indicatorilor radioactivi în biologie. *Ann. Rev. of Biochemistry*, 1940, 9, 641.
HUBER R. — Chimia fizică a celulelor şi a ţesuturilor, 1945.
ILIINA N. I. — Influenţa concentraţiei zaharozei asupra activităţii invertazei. *Docl. Acad. Nauc. S.S.S.R.*, 1950, vol. 71, nr. 2.
KREBS A. H. — Stadiile intermediare în oxidarea biologică a glucidelor. *Advances in Enzymology*, 1943, 3, 191.
LÂSENCO A. T. — Elemente noi în ştiinţa despre specia biologică. *Ann. Rom.-Sov.*, 1951, nr. 7, seria Biol.
LÂSENCO A. T. — Situaţia în ştiinţele biologice. 1948, Ed. P.M.R.
LEPEŞINSCAIA O. B. — Geneza celulelor din substanţa vie şi rolul substanţei vii în organism. Ed. Acad. R.P.R., 1952.
LIPPMANN F. — Formarea şi utilizarea energiei din grupările fosfat în metabolism. *Advances in Enzymology*, 1941, I, 100.
MACHEBOEUF M. — Cenapsele lipidoproteice. *Exposés annuels de Biochimie Médicale*, 1945, I-e série.
MARDAŞEV R. C. — Metode microbiologice şi enzimatice în determinarea cantitativă a aminoacizilor. *Uspehi Biologhicescoi Himii*, 1950, vol. I, 281—306.
MARDAŞEV S. R. — Decarboxilarea enzimatică a aminoacizilor. *Uspehi Sovremen. Biol.*, 1949, vol. 28, nr. 3, (6).
MARDAŞEV R. S., ETINGOF R. N. — Noi date asupra preparării unor decarboxilaze bacteriene ale aminoacizilor. *Biochimia*, 1948, vol. 13, nr. 6, 470.
MARTINSON E. E. — Lucrările lui M. V. Nenţchi asupra structurii şi însemnătăţii biologice a proteinelor. *Fiziol. Jurn. S.S.S.R.*, 1951, vol. 37, nr. 6.
MAYERHOF O. — Metabolismul intermediar al glucidelor. *Symposion asupra enzimelor respiratorii*, 1942.
NEMCINSCAIA L. V. — Depolimerizarea enzimatică a acidului desoxiribonucleic din nucleoproteide. *Biohimia*, 1950, vol. 15, nr. 6, p. 478.
NORTHROP H. J., M. KUNITZ, R. M. HERRIOTT. — Enzime cristalizate, 1948.
ODINŢOVA N. E. — Microorganismele ca indicatori biologici pentru vitamine. *Uspehi Sovremen. Biol.*, 1949, vol. 27, nr. 1.
OLNEANSCAIA, P. R. — Scoarţa cerebrală şi schimburile gazoase. 1952, *Actualităţi medicale*, Ed. de Stat.
OPARIN A. I. — Originea vieţii, 1951.
OPPENHEIMER C. — Fermenţii şi acţiunea lor. Vol. I, II, III, IV. 1925—29.
OPPENHEIMER C., STERN K. — Oxidarea biologică, 1939.
OSIPENCO T. D. — Chimismul reacţiei enzimatice de transaminare a aminoacizilor. *Docl. Acad. Nauc. S.S.S.R.*, 1950, vol. 75, nr. 1.
PALLADIN V. A. — Manual de Chimie biologică, Ed. de Stat, 1949.
PALLADIN V. A. — Biochimia creierului, 1952.
PARNAS O. I. — Chimismul sintezelor biochimice. *Uspehi Himii*, 1946, vol. 15, nr. 4.

Scanned with OKEN Scanner

PASÂNSCHI A. G. — Desvoltarea şi stadiul actual al fizico-chimiei proteinelor în U.R.S.S. *Uspehi Sovremen. Biol.*, 1949, nr. 3.
PASÂNSCHI A., CASTORSCAIA T. — Mecanismul fizicochimic al acţiunii penicilinei. *Biohimia*, 1947, vol. 12, nr. 6.
PASÂNSCHI A. G. — Desvoltarea şi stadiul actual al fizico-chimiei proteinelor în U.R.S.S. *Uspehi Sovremen. Biol.*,1949, vol. 28, nr. 36 (6).
PLOTNICOVA L. A. — Unele date privind biochimia creierului. Din *„Citoarhitectonica scoarţei creierului uman"*, cap. VIII, p. 169—187, 1949.
POLONOVSKI M. — Elemente de biochimie medicală, 1948.
PORTER R. I. — Chimia şi fiziologia bacteriilor, 1948.
PRINGSHEIM H. — Polizaharidele, 1931.
RACINSCHI V. V. — Cromatografia pe hârtie. *Uspehi Himii*, 1950, nr. 4.
SCHADE H. — Chimia fizică în medicina internă, 1920.
SCHLENCK F. — Chimia şi enzimologia acizilor nucleici. *Advances in Enzymology and related subjects of Biochemistry*, 1949, vol. 9.
SEMIACHIN M. M., HOHLOV S. A. — Chimia substanţelor antibiotice.
SISACHIAN M. N., COBIACOVA M. A. — Despre formarea şi deplasarea fermenţilor în organismele vii. *Biohimia*, 1951, nr. 3.
SISACHIAN N. M., COBIACOVA A. M. — Acţiunea fermentativă a structurilor protoplasmatice, *Biohimia*, 1949, nr. 1, p. 86.
SMERLING J. G. — Metabolismul acizilor aminaţi în placenta iepurilor şi a şobolanilor, *Biohimia*, 1950, nr. 1, vol. 15, 25—29.
SOBOTCA. — Chimia sterolilor, 1937.
TALMUD D. I. — Transformările morfologice ale proteinelor globulare. *Uspehi Biologhi cescoi* Himii, 1950, vol. 1, pag. 70—90.
THOMAS C. C. — Chimia aminoacizilor şi a proteinelor, 1944.
THOMAS P. — Manual de Biochimie, 1946.
TONGUR V. S., CAZMINA N. A. — Influenţa presiunii asupra proteinelor. Denaturarea sub presiune a albuminei din ser. *Biohimia*, 1950, vol. 15, nr. 3.
TOPPLEY C. W. W. — Principiile bacteriologiei şi imunologiei, 1948.
TOVARNIŢCHI V. I. — Complexele virus proteinice, *Biohimia*, 1945, nr. 2, p. 103—117.
TRIUS M. V., CLEBAMOVA A. A., SUNDUCOVA A. A. — Despre mecanismul de acţiune al streptomicinei. *Probl. Tuberc.* 1949, nr. 6.
TRUFANOV A. V. — Vitamina B^8, *Uspehi Sovrem. Biol.* 1950, vol. 29.
USPENSCHI N. I. — Teoria lui Pavlov cu privire la fiziologia digestiei şi evoluţia ei ulterioară. *Bull. Moscov. Obst. Ispăt. Prirodă*, 1949, nr. 5, p. 113—129
WILLSTÄTTER R. — Cercetări asupra enzimelor, vol. I—II, 1928.
WORK S. T., E. WORK. — Bazele chemoterapiei, 1948.
ZBARSCHI B. I., PEREVOSCICOVA. — Insuşirile contractile ale proteinelor nucleului celular. *Biohimia*, 1951 nr. 2.
ZILBER L. A. — Bazele imunităţii. Medghiz, Moscova, 1948.

Scanned with OKEN Scanner